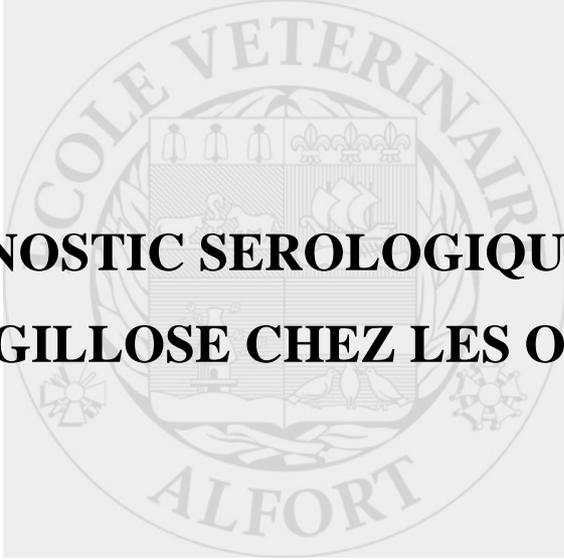


Année 2005



**DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE
L'ASPERGILLOSE CHEZ LES OISEAUX**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MÉDECINE DE CRETEIL

Le

par

Guillaume, Hugues Marie LE LOC'H

Né le 11 janvier 1980 à Paris 14^{ème} (Seine)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : M. Jacques GUILLOT

Professeur de Parasitologie à l'ENVA

Assesseur : M. Pascal ARNE

Maître de conférences de Zootechnie à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs PARODI André-Laurent, PILET Charles

Professeurs honoraires: MM. BORDET Roger, BUSSIERAS Jean, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, THERET Marcel, VUILLAUME Robert

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

| | |
|--|---|
| <p>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur* M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, AERC</p> <p>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE, MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur Mme VIALE Anne-Claire, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur* Mme COMBRISON Hélène, Professeur M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur* Mme HUYNH-DELERME, Maître de conférences contractuel M. TISSIER Renaud, Maître de conférences</p> | <p>- UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur* M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE BIOCHIMIE M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur* Mme ALCON Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>-DISCIPLINE : BIOLOGIE MOLECULAIRE Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences contractuel</p> <p>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> |
|--|---|

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjointe : Mme BEGON Dominique, Professeur

| | |
|---|--|
| <p>-UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* M. CLERC Bernard, Professeur Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. MORAILLON Robert, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences contractuel Melle MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur* M. TNIBAR Mohamed, Maître de conférences contractuel M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences Mme DESJARDINS-PESSON Isabelle, Maître de confér. contractuel</p> <p>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE M. MIALOT Jean-Paul, Professeur* (rattaché au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) Melle CONSTANT Fabienne, AERC (rattachée au DPASP)</p> | <p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur* M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle RAVARY Bérangère, AERC (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de Conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de Conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* M. RUEL Yannick, AERC</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur* M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Melle MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p>M. PARAGON Bernard, Professeur (rattaché au DEPEC) M. GRANDJEAN Dominique, Professeur (rattaché au DEPEC)</p> |
|---|--|

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. CERF Olivier, Professeur - Adjoint : M. BOSSE Philippe, Professeur

| | |
|---|--|
| <p>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. TOMA Bernard, Professeur M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD HOANG XUAN Nadia, Maître de confér. contractuel M. SANAA Moez, Maître de conférences</p> <p>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences* M. CARLIER Vincent, Professeur M. CERF Olivier, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> | <p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. BOSSE Philippe, Professeur M. COURREAU Jean-François, Professeur* Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Maître de conférences Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences associé M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p> |
|---|--|

Ingénieurs Professeurs agrégés certifiés (IPAC) :
Mme CONAN Muriel, Professeur d'Anglais
Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

Remerciements,

à M. le Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

à M. Jacques Guillot, directeur de thèse, Professeur de Parasitologie à l'ENVA, pour son aide à la réalisation de cette thèse,

à M. Pascal Arné, assesseur, Maître de conférences de Zootechnie à l'ENVA, pour ses conseils dans la réalisation de cette thèse et son soutien dans mon orientation professionnelle,

à Manju et Muriel pour leur accueil et leur aide au sein du service de Parasitologie de l'ENVA,

aux Docteurs André, Bougerol, Boussarie, Péricard, Quinton et Risi pour leur participation à l'étude expérimentale,

à mes parents, pour leur motivation et leur soutien dans mes choix,

à Aurélie, pour tout ce qu'elle m'apporte.

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'ASPERGILLOSE CHEZ LES OISEAUX

LE LOC'H Guillaume

Résumé

L'aspergillose est une maladie fréquente chez les oiseaux. Son diagnostic clinique est très difficile et peu d'examen complémentaires permettent un diagnostic de certitude. Le galactomannane, polysaccharide constituant de la paroi d'*Aspergillus fumigatus*, est l'antigène dont la détection par ELISA (Platelia® *Aspergillus*) permet le diagnostic de l'aspergillose invasive humaine. Nous avons recherché la présence de galactomannane dans 123 sérums provenant de 116 oiseaux prélevés soit pour un dépistage soit parce qu'ils étaient suspects d'aspergillose. Pour chaque sérum, une recherche d'anticorps précipitants par électrosynérèse a aussi été effectuée. Le but de cette étude était d'évaluer la valeur diagnostique de test ELISA Platelia® ainsi que son intérêt dans le suivi clinique de l'aspergillose pour l'échantillon étudié.

A partir des signes cliniques et des résultats de l'électrosynérèse, 3 groupes d'oiseaux ont été constitués : le groupe A (aspergillose très probable), le groupe B (aspergillose possible), le groupe C (aspergillose peu probable). En supposant que les oiseaux du groupe A soient malades et ceux du groupe C indemnes, il nous a été possible de calculer la sensibilité et la spécificité du test ELISA Platelia® (30% et 86%) pour ces oiseaux. Etant donné la faible sensibilité du test pour l'échantillon étudié ce test ne serait pas intéressant, utilisé seul, pour le diagnostic de l'aspergillose chez les oiseaux.

Trop peu d'oiseaux ont été prélevés plusieurs fois et le test Platelia® n'a pu être évalué dans le cadre du suivi thérapeutique. Le test Platelia® serait en revanche intéressant pour diagnostiquer des cas d'aspergillose avant les premières manifestations cliniques puisque 8 oiseaux prélevés pour un dépistage ont eu un résultat positif à l'ELISA.

Enfin, nous avons pu observer que les oiseaux présentant des signes d'aspergillose invasive ont plus souvent un résultat positif au test Platelia® (45%) que les oiseaux présentant uniquement des signes d'aspergillose respiratoire (23%). Le test Platelia® serait donc plus indiqué pour le diagnostic de l'aspergillose invasive que pour celui des formes localisées. D'autre part un test statistique nous a permis de démontrer que les résultats de l'électrosynérèse et ceux du test ELISA étaient indépendants.

Mots clés : *Aspergillus fumigatus*, aspergillose, galactomannane, diagnostic sérologique, ELISA, électrosynérèse, oiseau

Jury :

Président :

Directeur : Pr. GUILLOT

Assesseur : Dr. ARNE

Adresse de l'auteur :

M. Guillaume LE LOC'H, 4, allée du hameau d'Alfort, 94700 MAISONS-ALFORT

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN BIRDS

LE LOC'H Guillaume

Summary

Aspergillosis is a common disease in birds. Its clinical diagnosis is very difficult and few complementary tests result in a clear diagnosis. Galactomannan, a polysaccharide composing the cell wall of *Aspergillus fumigatus*, is the antigen whose detection by ELISA (Platelia[®] *Aspergillus*) allows diagnosis of invasive aspergillosis in humans. We have conducted research into the presence of galactomannan in 123 sera collected from 116 birds, whether during screening or because they were suspected of having aspergillosis. Each serum was also tested for precipitant antibodies by electrosyneresis. The aim of this study was to evaluate the diagnostic value of the ELISA Platelia[®] test, as well as its usefulness in the clinical follow-up of aspergillosis in this sample of 116 birds.

Using clinical signs and the results of electrosyneresis, three groups of birds were designated: group A, in which aspergillosis was considered to be very likely; group B, in which aspergillosis was possible; and group C, in which the presence of aspergillosis was unlikely. If we suppose that birds of group A are sick and birds of group C are healthy, we were able to calculate the sensitivity and specificity of the ELISA Platelia[®] test (30% and 86%, respectively) for these birds. Given the low sensitivity of the test in the sample, the usefulness of this test for diagnosing aspergillosis in birds, when used alone, appears to be limited.

Too few birds were tested more than once and the Platelia[®] test could not be evaluated within the framework of a therapeutic follow-up. The Platelia[®] test may be more useful in diagnosing cases of aspergillosis prior to the onset of clinical signs as eight birds without clinical signs showed a positive ELISA result.

Finally, we observed that birds, showing signs of invasive aspergillosis, were positive in the Platelia[®] test more often than birds showing only signs of respiratory aspergillosis (45% compared to 23%, respectively). The Platelia[®] test is therefore more useful in the diagnosis of invasive aspergillosis than for localized forms of the condition. On the other hand, a statistical test showed that the results of electrosyneresis and of the ELISA test were independent.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, aspergillosis, galactomannan, serological diagnosis, ELISA, electrosyneresis, bird

Jury:

President: Pr.

Director: Pr. GUILLOT

Assessor: Dr. ARNE

Author's address:

Mr. Guillaume LE LOC'H, 4, allée du hameau d'Alfort, 94700 MAISONS-ALFORT

Sommaire

| | |
|---|----|
| Liste des tableaux | 5 |
| Liste des figures | 7 |
| Introduction | 9 |
| I. Aspergillose aviaire..... | 11 |
| A. Champignons du genre <i>Aspergillus</i> | 11 |
| 1. Classification | 11 |
| 2. Biologie | 12 |
| 3. Identification | 13 |
| B. Epidémiologie | 13 |
| 1. Sources de champignons <i>Aspergillus</i> | 13 |
| 2. Modes d'infection | 15 |
| a) Voie respiratoire | 15 |
| b) Voie digestive..... | 15 |
| c) Voie cutanée | 16 |
| d) Voie transcoquillière | 16 |
| 3. Causes favorisantes | 16 |
| 4. Réceptivité et sensibilité..... | 17 |
| a) Espèces | 17 |
| b) Age | 18 |
| c) Etat de santé | 18 |
| d) Thérapeutiques | 18 |
| C. Pathologie..... | 19 |
| 1. Symptômes, manifestations cliniques | 19 |
| a) Forme aiguë..... | 19 |
| b) Forme chronique | 19 |
| 2. Lésions | 21 |
| a) Aspect macroscopique..... | 21 |
| b) Aspect microscopique | 22 |
| 3. Pathogénie | 23 |
| a) Déterminisme de la localisation des lésions..... | 23 |

| | | |
|------|---|----|
| b) | Déterminisme de la nature des lésions | 26 |
| 4. | Diagnostic..... | 26 |
| a) | Ante-mortem | 26 |
| (1) | Diagnostic clinique..... | 26 |
| (2) | Diagnostic différentiel..... | 27 |
| (3) | Examens complémentaires..... | 28 |
| (a) | Hématologie | 28 |
| (b) | Biochimie | 28 |
| (c) | Cytologie..... | 29 |
| (d) | Radiographie | 29 |
| (e) | Endoscopie | 31 |
| (f) | Microbiologie..... | 31 |
| (g) | Electrophorèse des protéines..... | 33 |
| (h) | Sérologie..... | 34 |
| b) | Démarche diagnostique..... | 34 |
| c) | Post-mortem | 34 |
| D. | Traitement et prophylaxie | 36 |
| 1. | Traitement | 36 |
| 2. | Prophylaxie..... | 38 |
| II. | Diagnostic sérologique de l'aspergillose et intérêt du dosage du galactomannane . | 41 |
| A. | Aspergillose invasive humaine..... | 41 |
| 1. | Généralités..... | 41 |
| 2. | Diagnostic sérologique de l'aspergillose invasive chez l'homme | 42 |
| B. | Caractéristiques antigéniques et développement d' <i>Aspergillus</i> | 44 |
| 1. | Antigènes aspergillaires et galactomannane | 44 |
| 2. | Cinétique du galactomannane chez l'homme et les animaux | 45 |
| 3. | Réponse immunitaire lors d'aspergillose chez les oiseaux | 46 |
| C. | Diagnostic sérologique chez les oiseaux..... | 48 |
| 1. | Détection d'anticorps | 48 |
| 2. | Détection d'antigènes..... | 49 |
| III. | Etude expérimentale..... | 51 |
| A. | Matériels et méthodes..... | 52 |
| 1. | Constitution des échantillons | 52 |
| a) | Choix des vétérinaires | 52 |

| | | |
|-----|--|-----|
| b) | Choix des animaux | 52 |
| 2. | Prélèvements | 53 |
| a) | Matériel | 53 |
| b) | Réalisation des prélèvements | 53 |
| c) | Conservation..... | 54 |
| 3. | Recueil des commémoratifs | 54 |
| 4. | Traitement des prélèvements sériques..... | 55 |
| a) | Recherche d'anticorps anti- <i>Aspergillus</i> par électrosynérèse..... | 55 |
| (1) | Principe..... | 55 |
| (2) | Protocole..... | 55 |
| (3) | Interprétation des résultats | 56 |
| b) | Recherche du galactomannane par ELISA Platelia® <i>Aspergillus</i> | 57 |
| (1) | Principe..... | 57 |
| (2) | Protocole..... | 58 |
| (3) | Interprétation des résultats | 59 |
| B. | Résultats | 60 |
| 1. | Résultats bruts | 60 |
| 2. | Etude statistique des résultats..... | 82 |
| IV. | Discussion | 87 |
| A. | Etude de la population examinée | 87 |
| B. | Réalisation des tests sérologiques | 87 |
| C. | Interprétation des résultats | 89 |
| | Conclusion..... | 93 |
| | Annexes..... | 95 |
| | Annexe 1 : feuille de commémoratifs A | 95 |
| | Annexe 2 : feuille de commémoratifs B..... | 98 |
| | Annexe 3 : feuille de commémoratifs C..... | 99 |
| | Bibliographie | 101 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : critères d'identification des principales espèces d' <i>Aspergillus</i> | 14 |
| Tableau 2 : espèces aviaires chez lesquelles des cas d'aspergillose sont fréquemment observés..... | 17 |
| Tableau 3 : fréquence des principaux signes cliniques rencontrés lors d'aspergillose (45 oiseaux ont été examinés) | 21 |
| Tableau 4 : fréquence des principales lésions anatomo-pathologiques rencontrées lors d'aspergillose (45 oiseaux ont été examinés)..... | 22 |
| Tableau 5 : posologies des molécules les plus fréquemment utilisées pour le traitement de l'aspergillose aviaire (posologies pour <i>Psittacus erithacus erithacus</i>)..... | 38 |
| Tableau 6 : présentation, symptômes et résultats des examens complémentaires du groupe A (forte suspicion d'aspergillose) | 62 |
| Tableau 7 : présentation, symptômes et résultats des examens complémentaires du groupe B (aspergillose possible) | 66 |
| Tableau 8 : présentation et résultats des examens complémentaires du groupe C (aspergillose très peu probable)..... | 74 |
| Tableau 9 : présentation, traitements et résultats des examens complémentaires des oiseaux pour lesquels plusieurs prélèvements ont été fournis..... | 76 |
| Tableau 10 : présentation, symptômes et résultats des examens complémentaires des oiseaux dont l'index Platelia® est supérieur ou égal à 1,5 | 77 |
| Tableau 11 : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative du test Platelia® lorsque les oiseaux positifs ont un index supérieur ou égal à 1,5 | 82 |
| Tableau 12 : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative du test Platelia® lorsque les oiseaux positifs ont un index supérieur ou égal à 1 | 83 |
| Tableau 13 : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative du test Platelia® pour <i>P. erithacus erithacus</i> pour 2 seuils de positivité | 84 |
| Tableau 14 : répartition observée des résultats de l'ELISA et de l'électrosynérèse | 85 |
| Tableau 15 : répartition théorique des résultats de l'ELISA et de l'électrosynérèse | 85 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : structure d'une tête aspergillaire..... | 12 |
| Figure 2 : coupe transversale d'une syrinx de poule domestique (<i>Gallus gallus domesticus</i>)..... | 23 |
| Figure 3 : sinus infraorbital d'un Psittacidé | 24 |
| Figure 4 : déplacements de l'air dans l'appareil respiratoire d'un oiseau durant un cycle inspiration-expiration | 25 |
| Figure 5 : radiographie dorso-ventrale d'un cygne tuberculé (<i>Cygnus olor</i>) suspect d'aspergillose | 30 |
| Figure 6 : culture d' <i>Aspergillus fumigatus</i> | 32 |
| Figure 7 : aspect microscopique de filaments et de têtes d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (X100) | 32 |
| Figure 8 : aspect microscopique des têtes d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (X400) | 33 |
| Figure 9 : aspergillome dans le sac aérien thoracique caudal gauche chez un cygne tuberculé (<i>Cygnus olor</i>)..... | 35 |
| Figure 10 : aspect macroscopique de l'intérieur d'un aspergillome pulmonaire | 35 |
| Figure 11 : structure du galactomannane | 44 |
| Figure 12 : répartition des sérums en fonction de leur index Platelia® | 81 |

Introduction

L'aspergillose est une maladie parasitaire très fréquente et souvent mortelle chez les oiseaux. Elle concerne un grand nombre d'espèces aviaires et est à l'origine de pertes économiques importantes dans les élevages de volailles. Ses conséquences médicales sont surtout importantes chez les oiseaux de compagnies importés et les oiseaux sauvages en captivité.

Le diagnostic de l'aspergillose aviaire est un véritable défi pour le vétérinaire praticien. Les expressions cliniques de la maladie sont très variées et souvent tardives. D'autre part, malgré de nombreux examens complémentaires disponibles, très peu permettent un diagnostic de certitude de la maladie et ce de manière inconstante. Le traitement de cette affection est fastidieux et souvent inefficace notamment à cause d'un diagnostic trop tardif. L'utilisation récente de tests sérologiques semble pouvoir résoudre en partie ce problème.

Le but de ce travail est de présenter l'aspergillose aviaire ainsi que les moyens diagnostiques qui lui sont associés et en particulier les tests sérologiques. Une étude prospective sur des oiseaux a été réalisée pour évaluer l'efficacité d'un test sérologique utilisé couramment en médecine humaine : le test ELISA Platelia® *Aspergillus*. Ce travail vise à apprécier l'intérêt de la détection du galactomannane d'*Aspergillus fumigatus* dans le sérum des oiseaux dans le cadre du diagnostic, du suivi et du dépistage de l'aspergillose.

I. Aspergillose aviaire

A. Champignons du genre *Aspergillus*

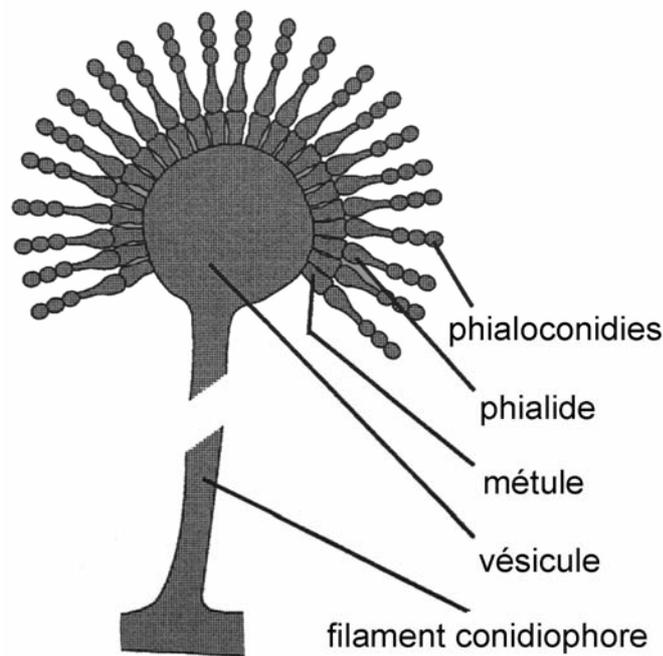
1. Classification

Le genre *Aspergillus* appartient au règne des Champignons (cellules eucaryotes, hétérotrophes et présentant une structure syncytiale) et à l'embranchement des Ascomycota regroupant les champignons à mycélium cloisonné et à reproductions sexuées (formation d'asques contenant des ascospores) et asexuées. Cet embranchement est divisé en deux classes : les Hémiascomycètes et les Ascomycètes, la zone ascogène des seconds étant protégée par un ascocarpe absent chez les premiers. Dans la classe des Ascomycètes, les trois ordres présentant un intérêt médical appartiennent au groupe des Prototunicatae et se distinguent par la nature de leurs ascocarpes et par le type de reproduction asexuée. Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent à l'ordre des Eurotiales caractérisé par des ascocarpes de type cléistothèce ou plus rarement gymnothèce et par une reproduction asexuée par phialides (11, 33).

Le genre *Aspergillus* est caractérisé morphologiquement par la présence de filaments conidiophores renflés à leur sommet par une vésicule partiellement couverte de phialides fixées ou non à des métules, le tout formant une entité spécifique appelée tête aspergillaire (figure 1) (7, 11).

Plus de trois cents espèces appartenant au genre *Aspergillus* ont été décrites. Les critères d'identification sont principalement morphologiques et physiologiques. Parmi les espèces responsables d'aspergillose chez les oiseaux, la plus communément rencontrée est *Aspergillus fumigatus* (5, 11, 24, 36). Plus rarement *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* sont mis en cause et Jones et Orosz (24) mentionnent aussi *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus* comme agents pathogènes possibles chez les oiseaux.

Figure 1 : structure d'une tête aspergillaire (d'après 11)



2. Biologie

Les champignons du genre *Aspergillus* vivent en saprobie dans le milieu extérieur et croissent sur la matière organique en décomposition. *Aspergillus fumigatus* est un champignon thermophile qui croît dans une large gamme de température (12 à 57°C avec un optimum autour de 38°C) et de pH (3,7 à 7,8). Très avide d'oxygène, sa croissance n'est complète que dans une ambiance bien aérée et une certaine humidité lui est favorable (7, 11, 33).

D'après sa classification, le genre *Aspergillus* présente deux types de reproduction : l'une asexuée et l'autre sexuée. En réalité certaines espèces comme *Aspergillus fumigatus* ne sont connues que sous leur forme asexuée (anamorphe) produisant des conidies donnant les têtes caractéristiques d'*Aspergillus* à l'exception d'*Aspergillus nidulans* qui produit aussi des asques et des ascospores (téléomorphe ou forme sexuée) (7, 11). Les conidies d'*Aspergillus fumigatus*, mesurant 2 à 3,5 μm de diamètre, sont très facilement mises en suspension dans l'air, favorisant la dissémination du champignon dans l'environnement (11).

3. Identification

Elle peut s'effectuer à partir de culture d'*Aspergillus* sur gélose de Sabouraud après incubation à 37°C. La croissance des colonies est rapide. Pour *Aspergillus fumigatus*, en deux à quatre jours apparaît une colonie blanche veloutée virant progressivement au vert ou gris bleuâtre. Le revers de la culture est foncé (7, 11, 33).

L'identification peut être complétée par observation microscopique d'un fragment de mycélium ; l'aspect et la constitution des têtes aspergillaires permet la diagnose de l'espèce (tableau 1).

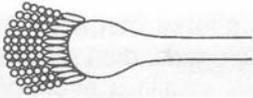
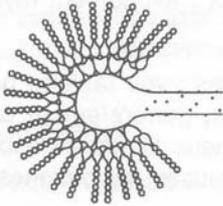
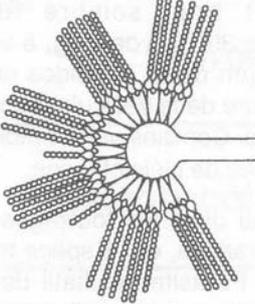
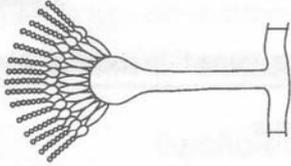
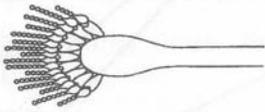
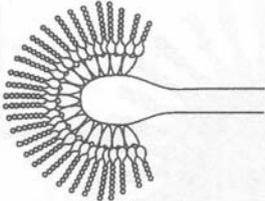
B. Epidémiologie

1. Sources de champignons *Aspergillus*

Les *Aspergillus* se développent particulièrement bien sur les matières végétales en décomposition. Ainsi la paille et le foin humides ou moisies sont des sources importantes de spores. De même le blé ou le maïs moisies sont à l'origine de la contamination de nombreux Anatidés. La litière et les aliments sont donc des sources de contamination pour les oiseaux d'élevage (1, 7, 11, 16). On a dénombré jusqu'à quatre millions de spores d'*Aspergillus fumigatus* par gramme de paille moisie dans des élevages de dindes où sévissait une aspergillose. Ils semblent que la litière et les aliments doivent être hautement contaminés pour provoquer une aspergillose clinique (7).

Les sources de contamination des oiseaux sauvages en captivité sont moins bien connues. Il pourrait s'agir d'aliments ou de litières moisies notamment les litières à base de copeaux de bois (1). Les cages et les sacs servant à la capture sont aussi incriminés. Le réveil d'une infection latente lors d'une diminution de l'état général de l'oiseau (stress, maladies...) semble aussi une possibilité (11).

Tableau 1 : critères d'identification des principales espèces d'*Aspergillus* (d'après 11)

| | <i>A. fumigatus</i> | <i>A. flavus</i> | <i>A. niger</i> | <i>A. nidulans</i> | <i>A. terreus</i> | <i>A. versicolor</i> |
|----------------------|---|---|---|--|---|---|
| tête aspergillaire |  |  |  |  |  |  |
| couleur des conidies | bleu verdâtre sombre | jaune verdâtre | noir | vert sombre | brun orangé | bleu verdâtre |
| reproduction sexuée | 0 | 0 | 0 | + avec cellules de Hülle en noisette entourant les cléistothèces | 0 | 0 |
| métule | 0 | ± | + | + | + | + |
| conidiphores | lisses, souvent verts en partie sup., 300 µm | échinulés | lisses, longs (1 - 3 mm) | lisses, bruns, très courts (< 130 µm) | lisses, 100 - 250 µm | lisses |

En revanche la contamination horizontale (d'animal à animal) paraît négligeable puisque les oiseaux infectés ne rejettent généralement pas de spores ; la maladie n'est donc pas contagieuse (7, 11).

De part son mode de vie saprobie, il n'existe pas de limite à la survie du champignon dans le milieu extérieur. Les conidies sont très résistantes quelles que soient les conditions de température, d'humidité et de sécheresse ; elles sont cependant détruites par les températures supérieures à 100°C et par le pentachlorophénate de sodium à 1% (11).

2. Modes d'infection

a) Voie respiratoire

La voie respiratoire est la voie d'infection la plus fréquente chez les oiseaux (1, 7, 11, 28). Les conidies, de très petites tailles, sont facilement mises en suspension dans l'air, leur concentration moyenne étant de 1 à 20 par mètre cube, et il a même été démontré que l'air filtré des hôpitaux pouvait véhiculer des spores aspergillaires (7, 34). La contamination se fait donc par inhalation des conidies. Leur taille leur permet de ne pas être stoppées par les barrières physiques de l'appareil respiratoire supérieures et d'atteindre directement les poumons ou les sacs aériens postérieurs (sacs aériens thoraciques caudaux et abdominaux) (7). En effet, une partie de l'air inspiré passe par les sacs aériens postérieurs avant d'atteindre les poumons (28). Les dindes qui inhalent des conidies peuvent développer une aspergillose invasive au bout 18 à 21 jours (18).

b) Voie digestive

Cette voie, peu fréquente, a été démontrée chez l'homme et les bovins. Elle fait généralement suite à l'ingestion d'aliments moisissus suivie d'une dissémination par voie hématogène (11). On peut supposer qu'elle existe chez les oiseaux considérant l'alimentation chez certaines espèces à base de végétaux souvent riches en spores.

c) Voie cutanée

Moins fréquente aussi, elle peut survenir suite à des blessures ou des traumatismes notamment des fractures ouvertes des os longs pneumatisés ou des lésions de la cavité générale avec atteinte d'un sac aérien et contamination secondaire de l'appareil respiratoire (11).

d) Voie transcoquillière

Devenue très rare suite aux progrès des techniques d'incubation, elle se fait par germination des conidies à la surface de l'œuf puis pénétration des hyphes à travers les pores de la coquille (7, 11). Cette voie aussi semble peu fréquente dans des conditions naturelles.

3. Causes favorisantes

La probabilité de contamination semble être directement dépendante du taux de contamination de l'air ambiant, toute cause provoquant une augmentation de la concentration de spores favorise l'apparition d'aspergillose chez les oiseaux (7, 11, 24, 36).

Certaines conditions climatiques, notamment la chaleur et l'humidité, favorisent la multiplication des champignons. En revanche, la dissémination des conidies dans l'air ambiant se fait d'avantage dans une ambiance sèche. Il semble donc qu'une période humide favorable à la sporulation suivie d'une période sèche favorable à la mise en suspension dans l'air soient une cause favorisante (24). Ainsi, de mauvaises conditions d'élevage avec des litières moisies ou non renouvelées, une accumulation de matières fécales, sont autant de causes favorisantes (24, 48).

Un défaut de ventilation est également une cause favorisante. L'aération joue en effet un rôle d'une part en diluant et évacuant les conidies et d'autre part en diminuant l'humidité de l'air ambiant et limitant ainsi la sporulation (27, 36).

Enfin, d'autres facteurs, souvent associés mais plus rarement impliqués, favorisent aussi l'inhalation de spores aspergillaires. Il s'agit notamment de l'hygiène des nichoirs, éclosiers et éleveuses et de la contamination possible des aliments industriels dans les silos par exemple (48).

4. Réceptivité et sensibilité

a) Espèces

Toutes les espèces d'oiseaux peuvent développer une aspergillose ; il existe cependant des variations de réceptivité et de sensibilité suivant les espèces. Parmi les espèces domestiques, le dindon et la caille semblent particulièrement sensibles. Parmi les oiseaux sauvages et de compagnie, certaines familles sont plus particulièrement touchées (tableau 2) : les Accipitridés (aigles, buses), les Alcidés (guillemots, pingouins), les Anatidés (canards, cygnes, oies), les Falconidés (faucons), les Phasianidés (faisans, perdrix), les Phoenicoptéridés (flamants), les Psittacidés (perroquets, perruches), les Sphéniscidés (manchots), les Struthionidés (autruches) et les Sturnidés (étourneaux, mainates) (11, 24, 43).

Tableau 2 : espèces aviaires chez lesquelles des cas d'aspergillose sont fréquemment observés (d'après 11, 24, 43)

| Famille | Nom commun | Nom scientifique |
|--------------|--------------------------|---------------------------------|
| Accipitridés | Autour des palombes | <i>Accipiter gentilis</i> |
| | Buse à queue rousse | <i>Buteo jamaicensis</i> |
| | Aigle royal | <i>Aquila chrysaetos</i> |
| Alcidés | Guillemot de Troïl | <i>Uria aalge</i> |
| Anatidés | Buse pattue | <i>Buteo lagopus</i> |
| | Pygargue à tête blanche | <i>Haliaeetus leucocephalus</i> |
| | Eiders | <i>Somateria sp</i> |
| | Cygne trompette | <i>Cygnus buccinator</i> |
| | Cygne tuberculé | <i>Cygnus olor</i> |
| Psittacidés | Amazone à front bleu | <i>Amazona aestiva aestiva</i> |
| | Perroquet gris d'Afrique | <i>Psittacus erithacus</i> |
| | cacatoès | <i>Cacatua sp</i> |
| Sturnidés | Mainate religieux | <i>Gracula religiosa</i> |

b) Age

Les jeunes sont plus sensibles à la maladie et il semble que les différences de sensibilité interspécifique soient aussi présentes chez les jeunes oiseaux notamment chez le Perroquet gris d'Afrique (*Psittacus erithacus*) (7, 11, 48). Les adultes sont aussi touchés par l'aspergillose. Il existe une forme particulière chez le dindon adulte se manifestant par des suffocations empêchant l'accouplement et par des baisses de performances d'élevage (7).

c) Etat de santé

Les traumatismes et les maladies intercurrentes notamment la mycoplasmosse, la tuberculose, la chlamydiophilose jouent un rôle important dans le développement de l'aspergillose chez les oiseaux en particulier les maladies chroniques dont l'évolution conduit à un affaiblissement notable de l'organisme et du système immunitaire (7, 11, 16). D'autre part il a été remarqué que les oiseaux mazoutés avaient une forte propension à développer une aspergillose (24, 43). Une alimentation inadaptée prédispose aussi au développement de la maladie particulièrement chez les Psittacidés (alimentation uniquement à base de graines). Ainsi une carence en vitamine A est à l'origine d'une hypertrophie et d'une hyperkératose des épithélia notamment au niveau de la syrinx favorisant leur colonisation par *Aspergillus* (5, 16, 38).

Chez les oiseaux sauvages, le facteur le plus important est le stress (1). Qu'il soit induit par la capture, les manipulations, les conditions d'entretien, le changement d'alimentation, de climat..., il induit une immunosuppression permettant le développement d'*Aspergillus* dans l'organisme (1, 7, 11, 16, 24).

d) Thérapeutiques

Une antibiothérapie prolongée ou une corticothérapie favorisent le développement d'une aspergillose. Les traitements de la chlamydiophilose à l'aide de tétracyclines sont particulièrement incriminés (11, 16, 48).

C. Pathologie

1. Symptômes, manifestations cliniques

a) Forme aiguë

Cette forme d'aspergillose est la moins fréquente. Elle fait suite à l'inhalation d'un grand nombre de conidies lorsque les conditions d'hygiène et d'entretien ne sont pas correctement respectées (48). Le système immunitaire même s'il est compétent est débordé par l'infection généralisée (24). La forme aiguë concerne surtout les jeunes oiseaux mais existe aussi chez les adultes notamment chez les espèces sauvages. Chez les jeunes psittacidés il semble que cette forme prédomine (48).

Les signes cliniques ne sont pas spécifiques. On peut observer une dépression, une léthargie, une perte de poids, une anorexie associée ou non à des vomissements ou à une stase du jabot, une polyurie, une polydipsie, une dyspnée, une ascite, une hépatomégalie, une cyanose (1, 16). L'oiseau peut ne présenter qu'un seul de ces signes voire mourir brutalement sans signes précurseurs (16). Ont ainsi été reportés des cas de rapaces apparemment sains ayant succombé d'aspergillose en 48h après un contact avec du foin moisi (1).

b) Forme chronique

Cette forme beaucoup plus fréquente se développe suite à l'exposition à une source de spores aspergillaires chez des oiseaux dont le système immunitaire est déprimé (7). Son expression clinique est très variable d'une espèce à l'autre et d'un individu à l'autre. En général, en l'absence de traitement, la mort survient en quelques semaines à quelques mois (11, 24). On peut cependant distinguer des formes focales et généralisées. Les formes focales peuvent concerner les cavités nasales ou la trachée et la syrinx. Les formes généralisées concernent les poumons et les sacs aériens avec une extension des lésions aux autres organes (1).

Les signes respiratoires, fréquents et divers apparaissent souvent tardivement et sont parfois absents. Lorsqu'ils sont présents, ils sont systématiquement évocateurs d'aspergillose. On peut observer une dyspnée se manifestant par une respiration bec ouvert, des battements rythmiques de la queue, une augmentation de l'amplitude des mouvements du bréchet ou des ailes écartées du corps, un jetage nasal, une hémoptysie, de la toux, une modification des bruits respiratoires (grincements, sifflements...) éventuellement audibles à l'aide d'un stéthoscope placé en région dorsale, une modification voire une disparition de la voix, une intolérance à l'effort, une cyanose (1, 5, 16, 24, 36, 39, 48). Lors d'aspergillose nasale on observera surtout une respiration bec ouvert, un jetage nasal et des narines obstruées voire une déformation du bec (1). Si la trachée ou la syrinx sont atteintes, seront surtout présentes une dyspnée inspiratoire associée à une modification ou disparition de la voix, ce dernier symptôme étant très évocateur d'une aspergillose (1, 16). Ces différents signes respiratoires s'expliquent principalement par la gêne mécanique aux échanges gazeux occasionnée à la fois par une obstruction des voies respiratoires et une diminution de l'efficacité de la ventilation (exsudat, caséum remplissant les sacs aériens) (16).

Des symptômes autres que respiratoires sont aussi fréquemment présents lors d'aspergillose. Il peut s'agir de signes généraux comme perte de poids, léthargie, dépression, cachexie, anémie. Des signes digestifs sont observés régulièrement avec des vomissements ou régurgitations, une diarrhée, une anorexie, une ascite, une hépatomégalie. Enfin, la biliverdinurie est un symptôme rénal très fréquent ainsi que la polyurie et la polydipsie.

Lors de formes plus rares d'aspergillose, on peut observer des parésies, paralysies ou boiteries unilatérales ou bilatérales survenant suite à des compressions du plexus lombo-sacré par des granulomes aspergillaires. En fin d'évolution peuvent aussi apparaître des signes nerveux centraux : ataxie, chute des perchoirs, opisthotonos, convulsions... Si d'autres appareils sont atteints on peut observer des conjonctivites, kératites, uvéites, ostéomyélites, dermatites aspergillaires (1, 5, 11, 16, 24, 30, 39, 48)... Les symptômes les plus fréquents, définis à partir de l'étude de 45 oiseaux, sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : fréquence des principaux signes cliniques rencontrés lors d'aspergillose (45 oiseaux ont été examinés) (d'après 5)

| Signe clinique | Fréquence |
|-----------------------------|------------------|
| émaciation | 64 % |
| détresse respiratoire | 26 % |
| troubles neuromusculaires | 18 % |
| modification des déjections | 11 % |
| régurgitations | 9 % |
| modification de la voix | 7 % |
| inappétence | 7 % |
| jetage nasal | 4 % |
| goutte | 4 % |
| hémoptysie | 2 % |

2. Lésions

a) Aspect macroscopique

Lors de forme chronique, la plus fréquente, l'appareil respiratoire est presque toujours atteint soit dans sa totalité soit partiellement (sacs aériens, poumons, syrinx, trachée, cavités nasales...) et on observe très souvent une pneumonie et une aérosacculite surtout des sacs aériens thoraciques postérieurs et abdominaux (5, 11, 27). D'autres organes peuvent être atteints comme le tube digestif, le foie, les reins, le système nerveux, les yeux, le squelette (notamment les os pneumatisés)... Des lésions de la cavité générale comme une péritonite peuvent être présentes (5).

L'aspect des lésions est quasiment le même quel que soit l'organe atteint (5). Il s'agit généralement de granulomes ou de plaques de couleur blanc-crème, caséux et friables, à

centre parfois nécrotique et non encapsulés avec éventuellement un « gazon mycélien » verdâtre constitué d'un enchevêtrement d'hyphes et de têtes aspergillaires (5, 11, 27, 28). Lorsque les muqueuses sont atteintes, on observe un épaissement inflammatoire de celles-ci associé à un exsudat séro-fibrineux verdâtre (28). Lors d'aspergillose nasale, fréquente chez les Psittacidés, on observe au niveau des narines des lésions granulomateuses sèches avec une destruction de la ramphotèque ainsi qu'une atteinte des vaisseaux sanguins, nerfs, cartilages et os de la région (47). Les lésions les plus fréquentes, définies à partir de l'étude de 45 oiseaux, sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : fréquence des principales lésions anatomo-pathologiques rencontrées lors d'aspergillose (45 oiseaux ont été examinés) (d'après 5)

| Lésion anatomo-pathologique | Fréquence |
|--|------------------|
| pneumonie granulomateuse | 66 % |
| aérosacculite fongique | 53 % |
| infection concomitante | 40 % |
| bronchopneumonie | 37 % |
| mycétome (pseudotumeur d'origine fongique) trachéobronchique | 20 % |
| nécrose aiguë et thrombose | 17 % |

b) Aspect microscopique

L'examen microscopique des granulomes montre en général un centre nécrotique entouré par des macrophages, des granulocytes hétérophiles et des cellules géantes multinucléées. Microscopiquement, l'épaississement des muqueuses est expliqué par un œdème, une congestion, un infiltrat constitué des mêmes cellules inflammatoires et éléments fongiques (5, 27).

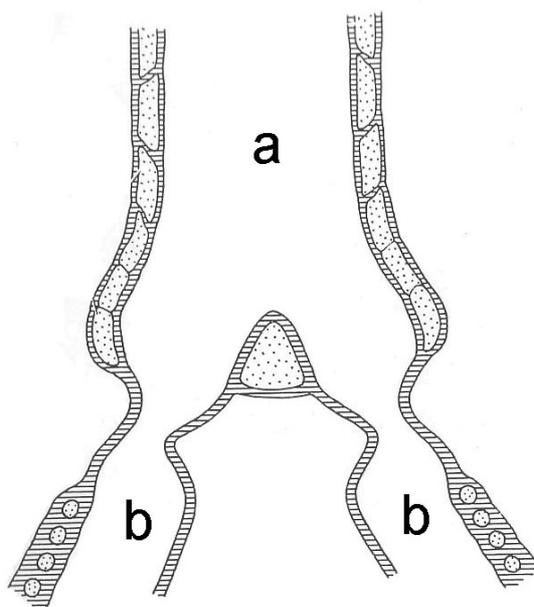
3. Pathogénie

a) Déterminisme de la localisation des lésions

La contamination primaire se fait généralement par voie respiratoire. Les conidies, liées aux poussières sont inhalées. Les plus grosses poussières qui véhiculent une grande partie des conidies sont arrêtées au niveau de l'appareil respiratoire supérieur. Elles sont plaquées contre la paroi trachéale et éliminées par l'escalator mucociliaire qui constitue la première ligne de défense de l'appareil respiratoire (7). Toute modification de celui-ci par exemple par des gaz toxiques comme l'ammoniac ou l'aldéhyde formique ou toute altération de l'épithélium trachéal par exemple lors d'hypovitaminose A favorise l'accumulation de conidies à ce niveau et leur passage dans l'appareil respiratoire profond (5, 7). Au niveau trachéal, certains sites sont préférentiellement atteints : il s'agit des zones de courbure de la trachée chez les oiseaux à long cou (anatidés, ardéidés...), de la syrinx (figure 2) et de la bifurcation trachéale. Les conidies ont tendance à s'y déposer à cause de la réduction de diamètre de ces zones et des turbulences du flux d'air qui y sont présentes (1).

Figure 2 : coupe transversale d'une syrinx de poule domestique (*Gallus gallus domesticus*)

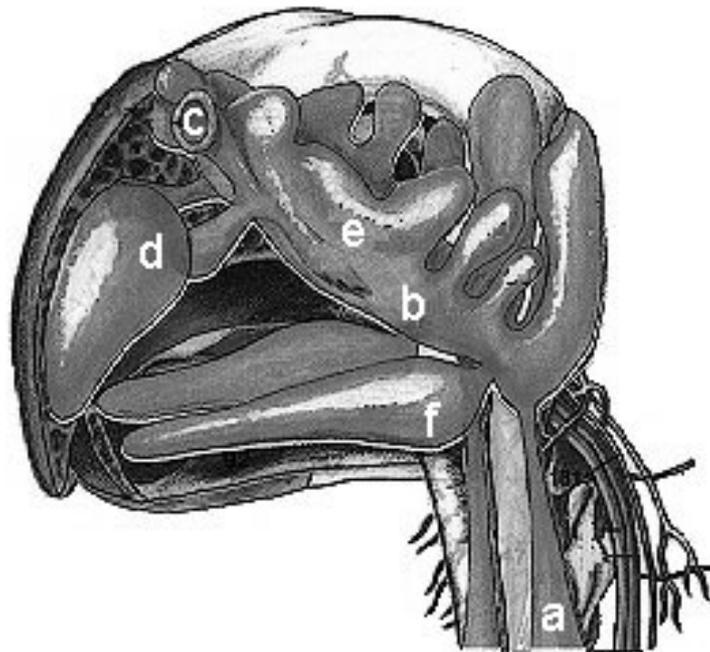
(d'après 35)



a trachée ; b bronches primaires

Le développement d'aspergillomes nasaux est particulièrement fréquent chez les psittacés. Ces derniers, contrairement aux autres oiseaux, possèdent des sinus infraorbitaires avec seulement deux ouvertures (figure 3). Cette particularité anatomique a pour conséquence un mauvais drainage de l'air dans les sinus y favorisant ainsi le dépôt de conidies (1).

Figure 3 : sinus infraorbital d'un Psittacé (d'après 9)

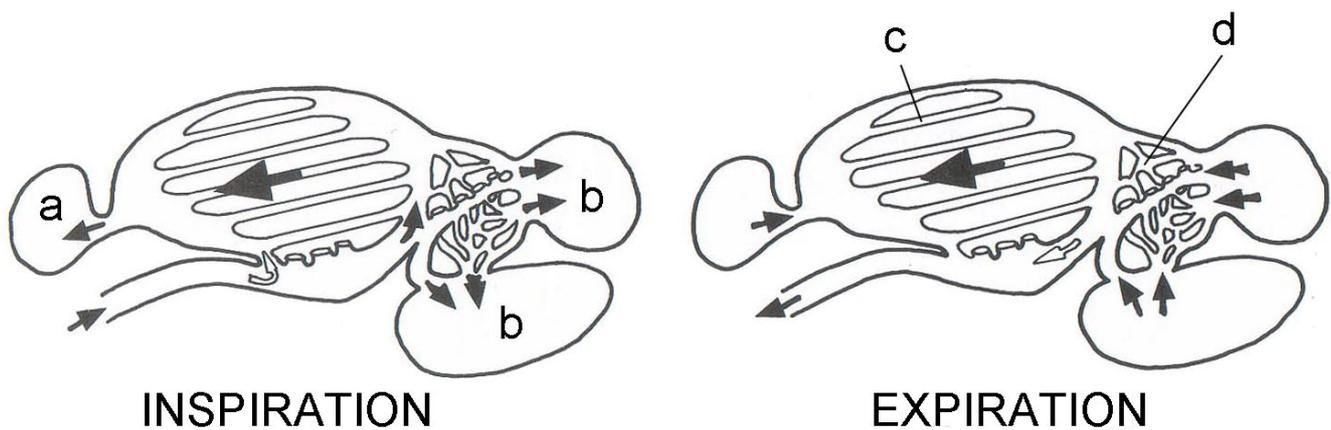


a sac aérien cervico-céphalique ; b sinus infraorbital ; c narine ; d diverticule rostrale du sinus infraorbital ; e diverticule infraorbital du sinus infraorbital ; f diverticule mandibulaire du sinus infraorbital

Les poussières et les conidies qui passent la barrière trachéale vont atteindre l'appareil respiratoire profond (7). Pour comprendre leur répartition, il est nécessaire de connaître la physiologie respiratoire des oiseaux. La circulation de l'air dans les poumons est assez complexe. Schématiquement, l'air est inspiré à travers la trachée, les bronches primaires et en partie les parabronches néopulmonaires dans les sacs aériens caudaux (sacs aériens abdominaux et thoraciques postérieurs) par la dépression créée par l'abaissement du sternum. La dépression se formant aussi dans les sacs aériens craniaux (sacs aériens thoraciques crâniens, claviculaire et cervico-céphaliques) attire l'air vicié des bronches secondaires et des parabronches paléopulmonaires dans ces sacs aériens. A l'expiration, les sacs aériens diminuent de volume, pressés par le bréchet. Il se forme donc une surpression dans les sacs

aériens caudaux qui pousse l'air frais inspiré vers les parabronches en passant par les bronches secondaires. Une partie de l'air passe à travers les parabronches néopulmonaires pour se rendre dans le poumon. La surpression dans les sacs aériens craniaux expulse l'air vicié par la trachée (figure 4).

Figure 4 : déplacements de l'air dans l'appareil respiratoire d'un oiseau durant un cycle inspiration-expiration (d'après 41)



a sacs aériens crâniens ; b sacs aériens caudaux ; c parabronches paléopulmonaires ; d parabronches néopulmonaires

Cette circulation de l'air explique le dépôt préférentiel des conidies dans les sacs aériens caudaux puisque l'air qui y arrive n'a pas encore traversé le poumon et n'a pas pu être filtré. L'air oxygéné qui y arrive y est de plus réchauffé et humidifié ce qui fait de ces sacs aériens un milieu adéquat pour le développement d'*Aspergillus* (7). Il a aussi été démontré une possible intervention du lipopolysaccharide (LPS) de *Pasteurella multocida*. Sa présence diminuerait l'efficacité de la clairance des particules étrangères au niveau de l'épithélium respiratoire ainsi que le rôle phagocytaire de celui-ci permettant alors aux conidies d'y séjourner plus longtemps et de s'y développer (37).

Suite au développement d'*Aspergillus* au niveau respiratoire, le champignon possédant un tropisme pour les vaisseaux sanguins, il peut y avoir passage de fragments de filaments dans le sang et donc contamination d'autres organes par voie hémotogène (11).

b) Déterminisme de la nature des lésions

Le pouvoir pathogène d'*Aspergillus* est de deux types. Il existe une action mécanique due au développement des filaments mycéliens provoquant une dissociation des tissus, une obstruction des vaisseaux et des conduits aérifères et jouant un rôle de corps étranger d'où la formation de nodules. D'autre part *Aspergillus* a une action toxique et antigénique (7, 11). Il produit diverses toxines dont l'une, appelée « gliotoxine » possède des propriétés immunosuppressives et nécrotiques reconnues (37).

Suivant les tissus rencontrés par les conidies, les réactions vont différer. Ainsi, les bronches primaires et secondaires, possédant des cellules lymphocytaires réparties sous forme d'infiltrations lymphocytaires disséminées, sont le siège de lésions exsudatives. Les sacs aériens, complètement dépourvus de structure de défense ne sont envahis par les leucocytes que par migration hors des vaisseaux lors de foyer infectieux à leur niveau ; on observe surtout des lésions exsudatives avec constitution d'un amas de caséum. Enfin, c'est dans le parenchyme pulmonaire, qui présente des foyers disséminés de petits lymphocytes que se retrouvent les nodules aspergillaires (7).

4. Diagnostic

a) Ante-mortem

(1) Diagnostic clinique

Il est toujours difficile voire impossible de diagnostiquer avec certitude une aspergillose chez un oiseau uniquement à partir de ses symptômes. En effet, la variété et le peu de spécificité des signes cliniques associés à l'aspergillose ne peuvent que conduire à une suspicion. Dans de rares cas, certains signes comme une modification de la voix seront cependant très évocateurs (24).

Pour établir une suspicion clinique d'aspergillose, il est nécessaire de s'intéresser à l'environnement de l'oiseau c'est-à-dire de rechercher d'éventuelles causes favorisantes. Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, une mauvaise hygiène de la cage ou des locaux, une ventilation inefficace, une alimentation inadaptée ou carencée sont autant de facteurs propices au développement d'une aspergillose. De même certaines espèces sont plus sensibles à cette maladie (tableau 2). L'historique de l'animal fournit également des indications importantes. Dans le cas d'oiseaux domestiques, il est bon de connaître la provenance de l'animal et dans le cas d'oiseaux sauvages les conditions de capture et de détention. Il faut systématiquement prendre connaissance de l'état de santé de l'oiseau et des traitements en cours. Ainsi un oiseau dont l'état général se détériore malgré la mise en place d'une antibiothérapie peut être suspecté d'aspergillose (16, 24, 43).

Dans les cas où un oiseau présente des signes cliniques très peu spécifiques comme un amaigrissement, un abattement et même dans certains cas en l'absence de symptômes il faut quand même suspecter une aspergillose si l'environnement et l'historique de l'oiseau sont très favorisants. Par exemple les psittacidés d'importation ou de contrebande ou les rapaces et les anatidés sauvages arrivant en centre de soins de la faune sauvage peuvent être presque toujours suspects d'aspergillose (43).

(2) Diagnostic différentiel

De part la très grande diversité des manifestations cliniques de l'aspergillose et le peu de spécificité des symptômes présents chez les oiseaux, il est difficile d'établir un diagnostic différentiel précis. Toutefois, on retrouve aussi une perte de poids associée à une leucocytose hétérophilique (cf. (3)(a)) lors de chlamydophiloses, de mycobactérioses et parfois de processus néoplasiques. Une dyspnée sévère peut, quant à elle, être observée lors d'une augmentation de la pression intracoelomique (masses, ascite, hépatomégalie, rétention d'œufs...), d'une pneumonie ou lors de l'inhalation d'un corps étranger (5).

(3) Examens complémentaires

(a) Hématologie

Les résultats d'un bilan hématologique peuvent parfois fortement suggérer une aspergillose. Il est fréquent de trouver chez un oiseau atteint d'aspergillose une leucocytose importante souvent supérieure à 20000 cellules par microlitre et atteignant parfois 100000 cellules par microlitre. Celle-ci est due à une granulocytose hétérophilique (1, 24). Cette modification se manifeste dès les stades précoces de la maladie parfois avant tout signe clinique (43). De même il est observé une monocytose (> 4%) et une lymphopénie et l'observation microscopique d'un frottis sanguin permet la mise en évidence lors de stades plus avancés de la maladie de granulocytes hétérophiles toxiques (1, 24, 43) Si le système immunitaire de l'oiseau n'est pas compétent, il se peut que la leucocytose soit absente. Enfin dans les cas d'aspergillose chronique, il est fréquent d'observer une anémie arégénérative (24).

(b) Biochimie

L'intérêt majeur de cet examen complémentaire est de mettre en évidence une hyperprotéïnémie surtout présente en cas d'atteinte chronique (24). En effet, en cas d'aspergillose, la sollicitation du système immunitaire provoque une augmentation des globulines sériques et donc une hyperprotéïnémie (16, 36). Plus accessoirement, l'élévation de certains paramètres biochimiques peut renforcer l'hypothèse d'une aspergillose. La proximité des sacs aériens avec certains organes notamment le foie peut être à l'origine d'une atteinte de ceux-ci. Par conséquent, il n'est pas rare d'observer une augmentation du taux d'aspartate aminotransférase et du taux d'acides biliaires due à un dysfonctionnement hépatique. De même, une élévation du taux de créatine kinase peut être observée suite à la fonte musculaire lors d'une atteinte chronique (16, 24, 36).

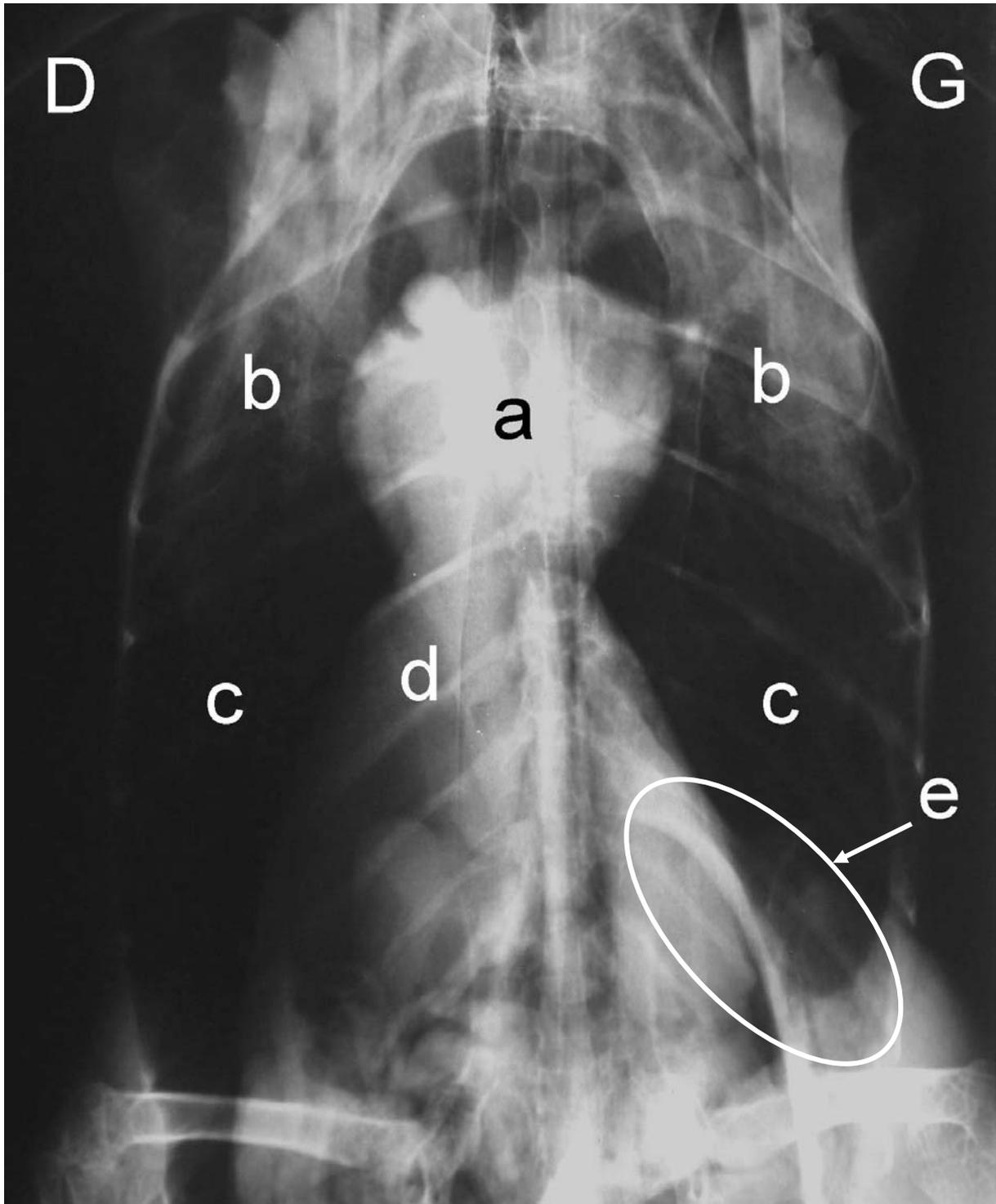
(c) Cytologie

L'examen cytologique d'échantillons prélevés dans l'appareil respiratoire est un examen complémentaire très intéressant puisqu'il peut permettre de confirmer un diagnostic d'aspergillose. Les échantillons peuvent être obtenus soit par biopsie sous endoscopie d'une lésion, soit par lavage trachéal ou d'un sac aérien, soit par rinçage des sinus... Lors d'ascite, le liquide obtenu par ponction au niveau de la ligne blanche peut contenir des éléments fongiques et donc servir au diagnostic. Dans tous les cas, la contamination par contact de l'échantillon avec le milieu extérieur doit être évitée. L'observation microscopique de l'échantillon, après coloration au bleu de méthylène, permet la visualisation de lésions typiques d'aspergillose avec la présence d'un grand nombre de granulocytes hétérophiles, de macrophages et de cellules géantes multinucléées associés à des éléments fongiques typiques (filaments mycéliens et parfois têtes aspergillaires) (24).

(d) Radiographie

Dans le cadre du diagnostic de l'aspergillose, la radiographie est l'un des examens complémentaires les plus utiles et les plus pratiques de part sa disponibilité, son faible coût et sa rapidité d'exécution (5, 16, 24, 36). De nombreux auteurs s'accordent toutefois pour dire que lorsque des lésions sont visibles à l'examen radiographique, le pronostic est sombre (43). D'autre part, l'absence de signes radiographiques ne permet en aucun cas d'exclure une aspergillose. Il est intéressant d'effectuer systématiquement deux clichés de la cavité coelomique (incidence ventro-dorsale et latéro-latérale). Les signes radiographiques lors d'aspergillose sont : une perte de définition du contour des sacs aériens ainsi qu'une asymétrie de ceux-ci, des opacités focales au niveau de l'appareil respiratoire (sacs aériens, poumons, syrinx, trachée...), une augmentation de l'épaisseur des sacs aériens (figure 5), une ascite, une hépatomégalie, une néphromégalie. La radiographie présente aussi l'intérêt de pouvoir être utilisée pour suivre l'évolution des lésions et donc l'efficacité du traitement (16, 24).

Figure 5 : radiographie dorso-ventrale d'un cygne tuberculé (*Cygnus olor*) suspect d'aspergillose (Clinique Faune Sauvage de l'ENVA)



a cœur ; b poumons ; c sacs aériens caudaux ; d foie ; e opacité des sacs aériens caudaux gauches et épaissement de leurs parois

(e) Endoscopie

Plus invasive que la radiographie, cet examen complémentaire est très utile puisqu'il fournit un accès visuel direct aux sacs aériens, à une partie des poumons et à certains organes dont la rate, le bord caudal du foie, les reins, les gonades, une partie du tube digestif. Lors de la recherche de lésions aspergillaires il est recommandé d'examiner grâce à un endoscope rigide les sacs aériens thoraciques et abdominaux gauches et droits ce qui implique de pratiquer une voie d'abord sur chaque flanc. De même, on inspecte la trachée, la syrinx et le départ des bronches primaires à l'aide d'un endoscope rigide que l'on introduit par la glotte. L'endoscopie présente l'avantage de pouvoir poser un diagnostic de certitude si des lésions typiques d'aspergillose sont visualisées. Des biopsies de ces lésions ainsi que des organes accessibles peuvent être réalisées et il est possible de réaliser cet examen en cours de traitement pour juger de son efficacité et de l'évolution de la maladie. De nombreux auteurs considèrent cet examen complémentaire comme indispensable et à pratiquer systématiquement lors d'une suspicion d'aspergillose (24, 36, 43). L'inconvénient majeur de cet examen est la nécessité d'anesthésier un oiseau qui présente parfois des troubles respiratoires et, en réalité, cet examen est également peu utilisé car peu de vétérinaires disposent de l'équipement adéquat. Si on désire explorer encore plus minutieusement la cavité coelomique, une laparotomie exploratoire est envisageable.

(f) Microbiologie

Cet examen consiste en la mise en culture d'un prélèvement. Ce prélèvement peut être réalisé par écouvillonnage des choanes ou de la trachée, par aspiration des sinus ou par biopsie sous endoscopie (5, 24). L'écouvillonnage profond de la trachée est le plus fréquent. Il peut être réalisé sur oiseau vigile ou préférentiellement anesthésié en introduisant l'écouvillon à travers la glotte le plus loin possible dans la trachée puis en le retirant sans entrer en contact avec la cavité buccale (43). L'échantillon sert ensuite à ensemer une gélose de Sabouraud à laquelle est ajouté du chloramphénicol pour inhiber les croissances bactériennes. L'incubation est faite dans une étuve à 37°C pendant au moins 48h. L'aspect de la culture et l'observation microscopique des champignons (figures 6, 7 et 8) permettent la diagnose de l'espèce d'*Aspergillus* (visualisation de têtes aspergillaires) et la différenciation avec d'autres champignons responsables de lésions identiques comme les Mucorales (thalle

très développé en non cloisonné) et les *Penicillium* (absence de vésicules) (24). Attention cependant, une culture positive en l'absence de toute lésion évocatrice ne permet pas de conclure à une aspergillose car les *Aspergillus* sont des contaminants habituels de l'environnement et de l'appareil respiratoire supérieur (5, 24, 36).

Figure 6 : culture d'*Aspergillus fumigatus* (Service de Parasitologie de l'ENVA)



Figure 7 : aspect microscopique de filaments et de têtes d'*Aspergillus fumigatus* (X100)
(Service de Parasitologie de l'ENVA)

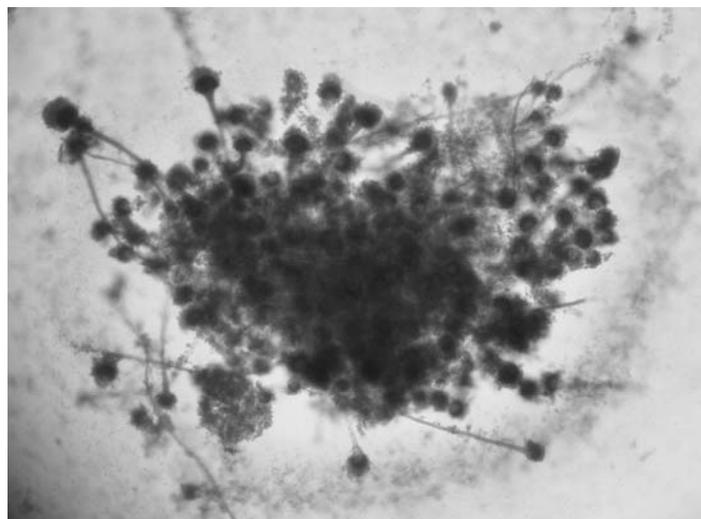
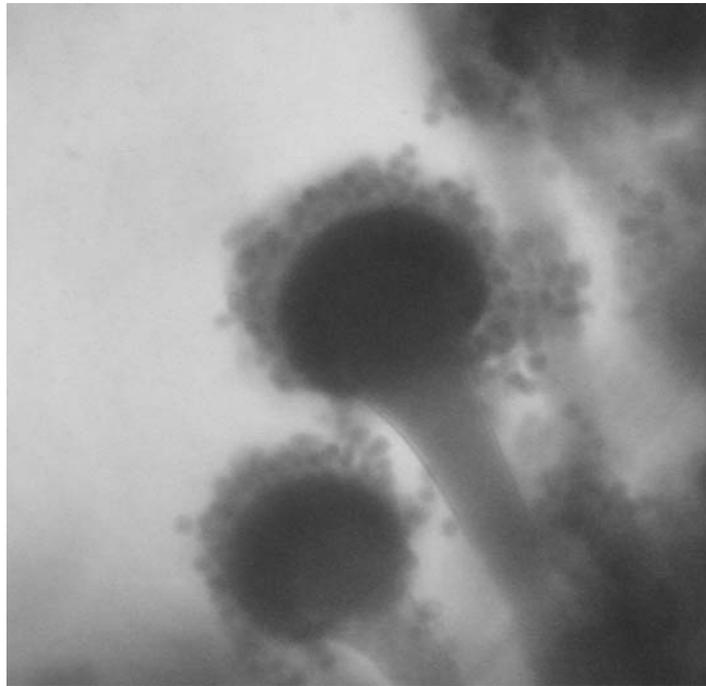


Figure 8 : aspect microscopique des têtes d'*Aspergillus fumigatus* (X400) (Service de Parasitologie de l'ENVA)



(g) Electrophorèse des protéines

L'électrophorèse des protéines sériques ou plasmatiques n'est qu'un examen d'orientation et ne permet pas de diagnostiquer à lui seul une aspergillose. Cette affection s'accompagne fréquemment de modifications importantes des différentes fractions protéiques dont les principales sont une augmentation notable des β -globulines notamment lors d'épisode aigu ainsi qu'une diminution du ratio albumine sur globulines due à une diminution de l'albumine et une augmentation des globulines. Dans certains cas d'aspergilloses chroniques, une augmentation des γ -globulines est aussi présente. Cependant les modifications du profil électrophorétique des protéines ne sont pas systématiques lors d'aspergillose (21, 24).

(h) Sérologie

Des tests sérologiques de détection des anticorps anti-*Aspergillus* ou des antigènes d'*Aspergillus* existent, nous les détaillerons dans la partie II.

b) Démarche diagnostique

Malgré le nombre important d'examens complémentaires disponibles pour orienter un diagnostic d'aspergillose, aucun n'est actuellement suffisant pour diagnostiquer avec certitude cette maladie chez les oiseaux. Différents auteurs recommandent par conséquent d'établir un protocole diagnostique en associant divers examens complémentaires. Ainsi Redig (43) associe la réalisation d'une culture à partir d'un écouvillonnage profond de la trachée à un examen endoscopique des sacs aériens et de la trachée complétés par un test sérologique de recherche d'anticorps.

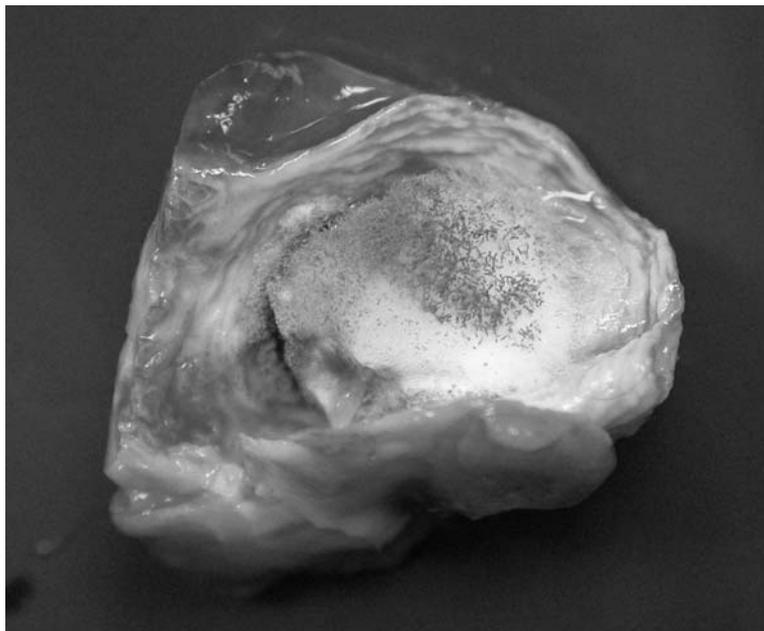
c) Post-mortem

La réalisation d'une autopsie permet généralement le diagnostic post-mortem de l'aspergillose. Il existe souvent des lésions caractéristiques dans les sacs aériens (figures 9 et 10) et les poumons qui doivent toutefois être distinguées des lésions causées par une tuberculose, une histomonose ou une mycoplasmosse. Cette distinction peut alors s'effectuer par examen microscopique direct d'un échantillon permettant la visualisation de filaments mycéliens ou de têtes aspergillaires ou après culture ou examen histologique d'une lésion (7, 11). Lors de lésions non spécifiques ou même absentes et si les éléments fongiques visualisés ne sont pas caractéristiques, il est possible de confirmer une aspergillose en utilisant une technique d'enzymo-immunohistochimie utilisant un premier anticorps anti-*Aspergillus* et un second anticorps anti-anticorps anti-*Aspergillus* mis au contact du tissu suspect (8, 22). Cette technique s'est révélée efficace pour diagnostiquer des aspergilloses chez des dindes et chez des inséparables (*Agapornis* sp) (8).

Figure 9 : aspergillome dans le sac aérien thoracique caudal gauche chez un cygne tuberculé
(*Cygnus olor*) (Clinique Faune Sauvage de l'ENVA)



Figure 10 : aspect macroscopique de l'intérieur d'un aspergillome pulmonaire (Clinique
Faune Sauvage de l'ENVA)



D. Traitement et prophylaxie

1. Traitement

Le traitement de l'aspergillose est souvent fastidieux et peu fructueux notamment lorsque des organes peu vascularisés comme les sacs aériens sont atteints ou lors de réactions granulomateuses. Le traitement est plus efficace lorsque différentes mesures sont associées. Ainsi un débridement chirurgical des granulomes associé à la fois à l'utilisation d'agents agissant directement sur les lésions et à une thérapie systémique est parfois nécessaire pour soigner un oiseau. De nombreuses molécules peuvent être utilisées : l'amphotéricine B, la 5-fluorocytosine, la nystatine, la rifampicine, le diméthycarbamate, la terbinafine et de nombreuses molécules de la classe des azolés : le kétoconazole, le miconazole, l'énilconazole, le clotrimazole, l'itraconazole et le fluconazole, (1, 5, 13, 16, 25, 36, 37, 42, 43). Plusieurs de celles-ci présentent une nette toxicité et sont déconseillées chez certaines espèces (cas du kétoconazole chez les Anatidés par exemple). En pratique, certaines molécules semblent plus efficaces et, actuellement, l'amphotéricine B et l'itraconazole sont les plus utilisés aux Etats-Unis. En France, les molécules les plus disponibles et les plus utilisées sont le fluconazole, la terbinafine, l'amphotéricine B (tableau 5). Une formulation vétérinaire de l'itraconazole sera mise sur le marché en 2005.

L'amphotéricine B est une molécule fongicide facilement disponible et reste une des molécules de choix. Son mécanisme d'action conduit à une altération de la perméabilité membranaire des champignons sensibles. Elle peut être utilisée à la fois en topique et en systémique. Il existe des crèmes à base d'amphotéricine B et la formulation destinée à l'utilisation intraveineuse peut être aussi utilisée en intra-osseux, intratrachéale ou directement injectée dans les sacs aériens atteints. Une étude pharmacodynamique indique une demi-vie courte nécessitant l'utilisation de doses élevées et répétées. Ainsi chez les rapaces la posologie intraveineuse est de 1,5 mg/kg/12h et la posologie intratrachéale de 1 mg/kg/12h. L'utilisation de l'amphotéricine B en nébulisation est aussi fréquente (1mg/mL) ; des séances de 15 minutes par jour pendant 5 à 7 jours sont alors préconisées. Rappelons cependant que seules des gouttes d'une taille inférieure à 4 µm peuvent atteindre l'appareil respiratoire profond nécessitant l'utilisation d'appareils de nébulisation particuliers permettant leur formation. Bien que l'action néphrotoxique de l'amphotéricine B soit bien documentée

chez les mammifères, elle ne semble pas avoir encore été décrite chez les oiseaux. Il est cependant recommandé par certains auteurs de réaliser une fluidothérapie lors de son utilisation (37).

Outre l'amphotéricine B, d'autres molécules peuvent être administrées en nébulisation. Le clotrimazole a été employé efficacement sur des rapaces et des Psittacidés et d'autres essais concernant l'utilisation de l'énilconazole sur des poulets et plus récemment sur des rapaces se sont révélés concluants (13, 25, 31). Certains auteurs recommandent aussi, en association avec d'autres molécules, l'utilisation en aérosol d'un désinfectant nommé F10 utilisé habituellement pour la désinfection des locaux et des cages (3, 44). Ce désinfectant à base d'ammoniums quaternaires et de biguanides a prouvé son efficacité dans le traitement de l'aspergillose chez des perroquets gris d'Afrique (*Psittacus erithacus*) en association avec la terbinafine (12).

L'itraconazole est l'azolé le plus utilisé par les vétérinaires aviaires en ce moment. Comme tous les azolés, il agit en perturbant la synthèse de la membrane plasmique du champignon provoquant sa mort, il s'agit donc d'une molécule fongicide. De part sa nature lipophile, l'itraconazole est mieux absorbé s'il est donné avec un aliment gras. Des variations importantes des concentrations plasmatiques existent suivant l'espèce aviaire considérée nécessitant la plus grande prudence dans l'extrapolation des posologies d'une espèce à l'autre ainsi qu'une surveillance clinique précise lors de l'utilisation de cette molécule. Il existerait une toxicité de l'itraconazole chez le Perroquet gris d'Afrique (*Psittacus erithacus*) (37). Le fluconazole présente une alternative à l'utilisation de l'itraconazole pour un traitement systémique.

Parallèlement à un traitement médical, un traitement chirurgical peut-être intéressant. Il consiste en l'exérèse des granulomes fongiques permettant une libération des voies respiratoires (cas des granulomes trachéaux entre autres) et une diminution de la quantité de champignons dans l'organisme. Cette exérèse peut être réalisée par le biais d'une laparotomie ou, mieux, lors d'une endoscopie. Une technique associant endoscopie et débridement à l'aide d'une diode laser est décrite et semble très intéressante (20).

En plus du traitement spécifique de l'aspergillose, une thérapie de soutien (fluidothérapie, gavage...) et des éventuelles complications notamment bactériennes sont à mettre en place.

Tableau 5 : posologies des molécules les plus fréquemment utilisées pour le traitement de l'aspergillose aviaire (posologies pour *Psittacus erithacus erithacus*) (d'après 37 et sources personnelles)

| | |
|----------------|--|
| Aérosol | Clotrimazole 10 mg/mL de polyéthylène glycol 30-60 min toutes les 12 h |
| | ou |
| | Amphotéricine B (Fungizone [®]) 1 mg/mL d'eau 15 min toutes les 12 h |

En association avec

| | |
|-------------------|--|
| Voie orale | Itraconazole (Sporanox [®] , Itrafungol [®]) 10 mg/kg toutes les 12 h |
| | ou |
| | Fluconazole (Triflucan [®] , Beagyne [®]) 15 mg/kg toutes les 12 h |
| | ou |
| | Terbinafine (Lamisil [®]) 10 mg/kg toutes les 12 h |

2. Prophylaxie

La prévention de l'aspergillose se fait par quatre approches simultanées : le maintien d'un environnement propre et d'une hygiène correcte pour minimiser le développement des champignons, la diminution du stress des oiseaux, l'utilisation d'un traitement médical prophylactique lors des périodes sensibles, la réalisation régulière de sérologies de contrôle (11).

Les deux premiers points ont déjà été traités auparavant. On peut toutefois rajouter l'intérêt en élevage d'utiliser certaines molécules comme l'énilconazole ou le thiabendazole en fumigation pour diminuer la charge fongique de l'environnement (13). Le traitement prophylactique qui peut être réalisé avec de la 5-fluorocytosine (50 à 60 mg/kg 2 fois par jour pendant 2 semaines) ou de l'itraconazole (10 mg/kg par jour pendant 10 jours) concerne trois catégories d'oiseaux : ceux ayant été blessés ou ayant subi un stress important suite à des

transports, manipulations, changements d'environnement, les jeunes juste après l'envol et les oiseaux sauvages capturés dans leur milieu naturel et placés en parcs zoologiques, centres de réhabilitation (1, 43)... Enfin, des contrôles sérologiques anticorps par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sont recommandés par Aguilar et Redig (1) lors de l'arrivée de tout nouvel individu. Ce dernier conseille de traiter comme mentionné ci-dessus tout oiseau dépassant le seuil de positivité du test ainsi que tous les oiseaux sensibles quelque soit le résultat de l'ELISA. Quatre contrôles par an sont ensuite recommandés (1).

Des essais de vaccinations par injections de suspensions inactivées d'*Aspergillus* ont été réalisés chez des manchots mais les résultats sont très variables (11). Des eiders et d'autres oiseaux aquatiques ont été vaccinés avec une préparation à partir de filtrat de cultures tuées par la chaleur. Une diminution de la mortalité a été observée parmi les oiseaux cliniquement atteints. Au parc zoologique de San Francisco, un programme de prévention associant vaccination et traitement prophylactique avec la 5-fluorocytosine a permis de contrôler efficacement les cas d'aspergilloses chez diverses espèces d'oiseaux (16, 43).

II. Diagnostic sérologique de l'aspergillose et intérêt du dosage du galactomannane

A. Aspergillose invasive humaine

1. Généralités

L'agent de l'aspergillose invasive chez l'homme est *Aspergillus fumigatus*. Cette affection est devenue l'infection la plus préoccupante en hémato-cancérologie (15). En quelques dizaines d'années, le taux d'infection des patients transplantés avec des cellules hématopoïétiques est ainsi passé de 4-5% à 12-15% (49). *Aspergillus* est devenu un pathogène majeur chez les patients transplantés avec de la moelle osseuse et des cellules souches périphériques puisque malgré les traitements existants, le taux de mortalité de l'infection varie de 70 à 100% (38). De plus, la population à risque ne cesse de grandir, les deux principaux facteurs favorisants étant les neutropénies profondes et prolongées et la corticothérapie (15). La contamination des patients s'effectue par inhalation de spores et plus rarement par ingestion de spores (10).

L'aspergillose invasive peut prendre quatre formes : une forme pulmonaire aiguë ou chronique, une forme trachéobronchique, une forme rhinosinusale et une forme disséminée (encéphale, peau, reins, foie, cœur et œil) (30). Chez le sujet immunocompétent, l'inhalation de spores d'*Aspergillus fumigatus* est rarement pathogène. Elle peut toutefois être responsable de formes allergiques. Quelles que soient ses formes, l'aspergillose invasive est difficile à mettre en évidence surtout en début d'évolution. Il est rare d'obtenir des cultures positives à partir d'un prélèvement réalisé par lavage trachéo-bronchique et les symptômes sont peu spécifiques (hyperthermie, toux, douleur thoracique, perte de poids, dyspnée...). Les examens complémentaires de choix sont : la radiographie du thorax, la mise en culture et l'examen microscopique des prélèvements respiratoires et la détection d'antigènes aspergillaires (34).

L'efficacité des traitements de l'aspergillose reste encore relativement faible malgré des avancées permanentes. La mise en place précoce du traitement est problématique à cause de l'impossibilité de diagnostiquer une aspergillose suffisamment tôt (45). Cependant de

nouvelles molécules apportent des résultats prometteurs. En première ligne il s'agit d'un nouveau triazolé, le voriconazole, dont l'administration peut être intraveineuse ou orale et dont la tolérance est bonne comparée aux autres molécules anti-aspergillaires. L'amphotéricine B lipidique, l'itraconazole administré par voie intra-veineuse et d'autres triazolés de nouvelle génération (posaconazole et ravuconazole) ainsi que la caspofungine (une échinocandine) semblent aussi intéressants et sont actuellement étudiés dans le cadre du traitement de l'aspergillose (15, 49).

2. Diagnostic sérologique de l'aspergillose invasive chez l'homme

L'aspergillose invasive humaine, au même titre que l'aspergillose aviaire, est une infection difficile à diagnostiquer précocement. Plusieurs méthodes diagnostiques existent mais il semble que les méthodes sérologiques soient les plus intéressantes.

Pour la détection des anticorps anti-*Aspergillus*, plusieurs techniques sont actuellement disponibles : hémagglutination indirecte, immunoprécipitation en milieu gélosé (immunodiffusion double de Ouchterlony, immunoélectrophorèse), immunoprécipitation sur bande d'acétate de cellulose (électrosynérèse), ELISA, immunofluorescence indirecte, fixation du complément (2, 14, 19). Leur spécificité est correcte puisqu'on retrouve des valeurs supérieures à 72% pour huit de ces techniques. En revanche, leur sensibilité est décevante probablement en raison d'une faible production d'anticorps liée à l'immunodépression des patients. En plus d'être peu sensible dans cette population, la sérologie ne donne habituellement un résultat positif qu'une fois le diagnostic d'aspergillose invasive posé (19). Les techniques de références sont l'immunoélectrophorèse et l'immunodiffusion double de Ouchterlony mais leur réalisation est longue (5 à 7 jours pour l'immunoélectrophorèse). L'électrosynérèse présente une meilleure sensibilité et est plus rapide (un jour) mais peut parfois donner lieu à des difficultés de lecture quand les arcs de précipitation sont de faible intensité (2).

En ce qui concerne l'antigénémie aspergillaire, les deux tests les plus pratiqués utilisent des anticorps monoclonaux qui reconnaissent le galactomannane d'*Aspergillus*. Il s'agit du Pastorex[®] *Aspergillus* qui est un test d'agglutination de billes de latex commercialisé

depuis 1990 et du Platelia[®] *Aspergillus* qui est un ELISA sandwich mis sur le marché en 1996. La spécificité du test Pastorex[®] est bonne : elle varie selon les études de 86 à 100%. En revanche, sa sensibilité est modeste notamment au moment du diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive puisqu'elle est alors de 12 à 27%. Ce test ne détecte en effet le galactomannane qu'au dessus d'une concentration de 25 ng/mL de sérum. Le seuil de détection du test Platelia[®], beaucoup plus bas, est de 1 ng/mL de sérum ce qui explique une bien meilleure sensibilité de ce test (19). Une étude a ainsi montré une sensibilité de l'ELISA de 72,4% contre 13,8% pour le test au latex et une positivation en ELISA observée dans 62% des cas avant la survenue des signes cliniques. La technique ELISA présente donc l'avantage d'une grande sensibilité et d'une valeur prédictive positive certaine, sous réserve que chaque résultat positif soit confirmé par plusieurs prélèvements séquentiels montrant une augmentation de l'antigénémie (14). De plus, l'ELISA détecte une antigénémie 2-3 semaines avant le test au latex. Cependant des réactions faussement positives ont été observées atteignant 8%. Une partie de ces réactions ne seraient en fait pas faussement positive. Du galactomannane d'origine digestive et/ou fécale passerait dans la circulation à l'occasion d'une rupture de l'intégrité de la barrière intestinale et serait en effet détecté par le test Platelia[®] (34). De même, le galactomannane de *Penicillium*, *Alternaria* et *Paecilomyces* est détecté par l'ELISA (6). En revanche, il a été démontré que l'acide lipoteique de *Bifidobacterium* cause une réaction positive de l'ELISA à l'origine de faux positifs (32).

La détection de l'ADN d'*Aspergillus* par PCR dans le sang est une voie prometteuse. Les études publiées montrent que ces tests ont une bonne sensibilité allant de 54 à 100% et une spécificité généralement supérieure à 89% pour le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive. Une étude a été menée pour comparer l'efficacité de l'ELISA (test Platelia[®]), de la PCR (test GeniQ-Asper[®]) et d'un test de détection du (1→3)-β-D-Glucane (BDG) (test β-glucan Wako[®]) dans le cadre du diagnostic de l'aspergillose invasive chez l'homme. Ces tests ont été réalisés chez 96 patients atteints de troubles hématologiques et présentant un fort risque de développer une aspergillose invasive. Pour l'ELISA, la PCR, et le test de détection du BDG, les sensibilités et spécificités ont été calculées et sont respectivement de 100% et 93%, 55% et 93% et 55% et 93%. Dans cette étude, le test Platelia[®] est donc le plus sensible pour détecter une aspergillose invasive, en revanche les trois tests ont une très bonne spécificité qui est identique (26).

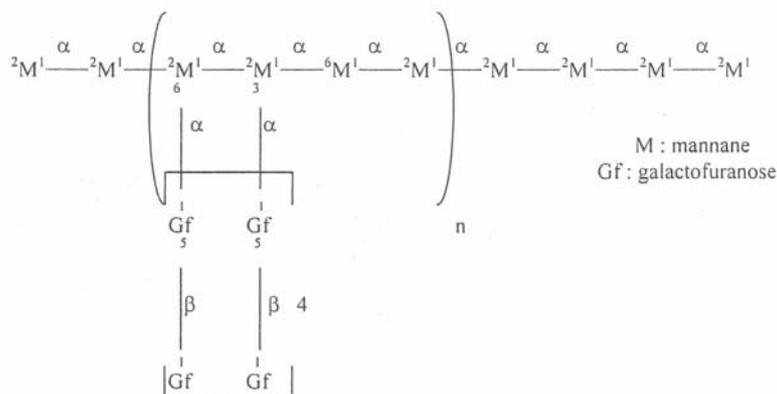
B. Caractéristiques antigéniques et développement d'*Aspergillus*

1. Antigènes aspergillaires et galactomannane

On répertorie une centaine de protéines et de glycoprotéines d'*Aspergillus fumigatus* capables de se lier aux anticorps produits par la réponse immunitaire d'un individu immunocompétent. Ces antigènes ont été étudiés par immuno-empreinte et classés selon leur masse moléculaire (34).

Le galactomannane est un polysaccharide constituant de la paroi d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Il est aussi présent dans leur cytoplasme. Il est secrété durant la phase de croissance active du champignon, au sein d'un complexe composé de protéines et de polysaccharides. Sa structure consiste en une chaîne linéaire de mannoses liés en $\alpha(1-2)$ et en $\alpha(1-6)$ dans un rapport 3:1. Des tétramères de $\beta(1-5)$ galactofuranes constituent la partie antigénique de la molécule. Se créent ainsi des chaînes de cinq galactofuranes liées aux carbones 3 et 6 d'une paire de $\alpha(1-2)$ mannoses (figure 11). Ces tétramères sont communs à tous les galactomannanes d'*Aspergillus* et *Penicillium* testés jusqu'à présent. Une molécule de galactomannane contient environ 10 épitopes, ce qui rend possible la mise au point d'une méthode de détection par double ELISA sandwich. On pense aujourd'hui que de nombreuses protéines sont porteuses de cet épitope mais aucun travail n'a été publié à ce jour sur ce thème (30, 32, 34, 45).

Figure 11 : structure du galactomannane (d'après 29)



2. Cinétique du galactomannane chez l'homme et les animaux

La détection du galactomannane a été évaluée dans plusieurs milieux. Actuellement les chercheurs sont arrivés à la conclusion que le sérum présente chez l'homme de nets avantages par rapport à l'urine. Effectivement, sur les mêmes patients la quantité de galactomannane détectée dans le sérum est toujours supérieure à celle détectée dans l'urine et la détection sérique est significativement plus précoce que la détection urinaire, respectivement de 39 et 12 jours en moyenne avant la mort du patient avec le test Platelia[®]. Cependant la détection dans le sérum n'est efficace qu'à condition d'utiliser des méthodes efficaces de dissociation des immunocomplexes et de précipitations des protéines sériques rendant les épitopes accessibles aux anticorps. De même le développement de tests toujours plus sensibles assure une détection toujours plus précoce de l'antigénémie (45).

D'autre part l'antigénémie considérée habituellement comme transitoire semble en fait être constante. Ainsi lors d'une étude en médecine humaine, les sérologies des patients positifs lors d'un premier test se sont toutes révélées positives avec une augmentation de l'antigénémie lors du développement de la maladie (45).

L'étude de l'élimination du galactomannane a été réalisée sur le lapin et le rat. Il apparaît que deux mécanismes tendent à soustraire rapidement le galactomannane du flux sanguin. Le premier dans le temps est sa captation par les cellules de Kupffer. Le second est l'élimination rénale. L'étude de l'antigénémie sur ces modèles a mis en évidence des fluctuations importantes de la concentration sérique de galactomannane dues aux deux voies d'élimination. Il apparaît donc important chez l'homme et probablement chez l'animal de réaliser plusieurs analyses (à un rythme bi-hebdomadaire idéalement) dans le but de minimiser le risque de ne pas détecter un malade dont l'antigénémie serait passée transitoirement sous le seuil de détection (34).

L'antigénémie semble aussi varier en fonction de l'organe atteint. Ainsi, les vaches atteintes d'aspergillose du tube digestif présente une antigénémie négative. Ces résultats s'expliqueraient par le passage du sang provenant du tube digestif via la veine porte au foie et donc une élimination hépatique quasi-immédiate du galactomannane. Un autre exemple est fourni par les vaches présentant une aspergillose placentaire chez lesquelles les éléments

fongiques restent cantonnés à la circulation fœtale conduisant à une antigénémie négative chez la mère (23).

Chez les oiseaux, les quelques études réalisées conduisent aux mêmes observations. L'antigénémie pourrait en effet être négative dans certains cas à cause de la demi-vie courte du galactomannane ou varier suivant l'organe atteint. De même, les antigènes peuvent être retenus dans les immunocomplexes non circulants. Inversement, il semblerait qu'une faible antigénémie soit commune chez des oiseaux sains (21, 24). Une étude expérimentale sur des canards inoculés avec des *Aspergillus* par voie trachéale a démontré, à l'aide d'une méthode d'ELISA par inhibition, la détection d'une antigénémie 21 jours après inoculation. Les auteurs observent une variation importante de l'antigénémie parmi les oiseaux développant une aspergillose et ils concluent que la détection d'une antigénémie supérieure ou égale à 65 ng/mL est indicative d'une aspergillose invasive chez les oiseaux (18).

3. Réponse immunitaire lors d'aspergillose chez les oiseaux

Lors d'aspergillose, des réactions immunitaires de type cellulaire et humoral se mettent en place. La réaction cellulaire serait plus importante comme le suggère le développement important de l'aspergillose invasive chez les patients humains dont l'immunité cellulaire est déprimée. D'autre part des anticorps précipitants sont trouvés chez 90 à 100% des patients présentant un aspergillome alors que seulement 57% des patients atteints d'aspergillose invasive présentent des anticorps précipitants (17).

Chez les oiseaux, la bourse de Fabricius est le seul organe dans lequel les lymphocytes B sont sélectionnés. Ces cellules produisent différentes immunoglobulines (Ig) : les IgM présentes surtout dans le sérum et le blanc de l'œuf, les IgA retrouvées majoritairement dans les sécrétions respiratoires et intestinales et les IgY qui sont les Ig les plus représentées dans le sérum et dans le jaune d'œuf et qui jouent un rôle équivalent aux IgG et IgE des mammifères (46).

La réponse humorale des oiseaux est généralement identique à celle des mammifères. Les IgM sont produites en majorité durant la première réponse immunitaire, immédiatement après la première exposition à l'antigène. En effet, les IgM peuvent être détectées 72 h après

l'inoculation de l'antigène. La production d'IgM est en revanche de courte durée. Après une injection unique d'antigène, le pic survient entre 4 et 8 jours puis le taux d'IgM décline rapidement. Ce pic est suivi par la production d'IgY. Cependant à l'occasion d'infection bactérienne chronique, une réponse prolongée en IgM peut se manifester (46).

La réponse immunitaire lors d'aspergillose a été étudiée chez les oiseaux grâce à un test ELISA détectant spécifiquement les IgM et IgY dirigées contre *Aspergillus*. Il a ainsi été démontré la présence de deux pics. Le premier est précoce (2 semaines post-inoculation) et correspond à une production d'IgM. Le second plus tardif (pic à 63 jours post-inoculation) concerne les IgY dont la concentration n'augmente qu'à partir de la deuxième semaine. Le taux d'Ig diminue ensuite rapidement avec la cessation de la stimulation antigénique mais, lors d'un nouveau contact avec *Aspergillus*, une réponse rapide est observée grâce à la mise en jeu de la mémoire immunitaire (17, 24). La production d'anticorps chez des oiseaux immunisés ou non contre *Aspergillus* a été étudiée chez des canards (*Anas platyrhynchos* et *Tadorna cana*). Tous les canards ont été inoculés avec *Aspergillus* ($3,5 \times 10^4$ spores d'*Aspergillus* sp administrés par voie intratrachéale) et une partie seulement a été immunisée ensuite contre le champignon par administration à 7, 10, 14, 21, 28, 35 jours d'une suspension constituée à partir de cultures d'*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*. Les taux d'anticorps et d'antigènes des deux groupes d'oiseaux ont été mesurés. Dans les deux groupes d'oiseaux la production d'anticorps est importante mais elle est plus rapidement mise en place chez les oiseaux immunisés. En revanche, les taux d'anticorps moyens produits par les deux groupes d'oiseaux ne sont pas significativement différents. L'antigénémie a aussi été mesurée et seuls les oiseaux non immunisés présentent une antigénémie détectable (18).

Les titres en anticorps ont aussi été étudiés chez des oiseaux ayant une aspergillose avérée et après la mise en place d'un traitement. Le taux d'anticorps augmente pendant les deux premières semaines de traitement puis commence à décliner après la quatrième semaine et continue ainsi à diminuer jusqu'à la huitième ou douzième semaine date à laquelle le traitement peut être alors stoppé (17).

Dans certains cas, malgré une aspergillose avérée, les anticorps ne sont pas détectés. Deux raisons principales permettent d'expliquer ces cas. La première est l'incapacité à produire une réponse humorale suffisante notamment chez les oiseaux trop débilisés, immunodéprimés ou chez lesquels l'infection est déjà trop importante. La seconde est la

localisation de l'infection qui dans certains cas limite la stimulation antigénique. Il peut s'agir par exemple d'infections localisées aux sacs aériens, structures peu vascularisées et dépourvues de tissu lymphoïde (21, 24).

C. Diagnostic sérologique chez les oiseaux

1. Détection d'anticorps

De nombreuses techniques de détection des anticorps anti-*Aspergillus* ont été testées chez les oiseaux. Il s'agit de méthodes d'immunodiffusion sur gel d'agar, immunodiffusion double de Ouchterlony, immunoélectrophorèse, dosage radio-immunologique, hémagglutination indirecte et ELISA. Les deux techniques les plus utilisées restent l'immunodiffusion double de Ouchterlony et l'électrosynérèse car ce sont des techniques simples à mettre en œuvre, peu coûteuses et dont les sensibilités et spécificités sont satisfaisantes (16, 24). Cependant des études menées aux Etats-Unis notamment par Redig (24) montrent l'intérêt de la sensibilité des techniques ELISA par rapport aux autres techniques. Ainsi, la technique d'immunodiffusion sur gel d'agar ne permet le diagnostic de l'aspergillose que dans les stades avancés de la maladie ceci s'expliquant notamment par la détection des seules IgY alors que l'ELISA qui détecte les IgM et IgY peut donner un résultat positif une semaine après l'exposition à des spores d'*Aspergillus*. De même, seule l'ELISA est capable de détecter de faibles taux d'anticorps (24).

Deux ELISA ont été développées spécifiquement pour le diagnostic de l'aspergillose aviaire. La première technique est une ELISA indirecte mise en place au Raptor Center de l'Université du Minnesota par Redig (24). Différents anticorps anti-Ig sont utilisés suivant l'espèce mise en cause (anticorps anti-Ig de Falconidés, Psittacidés ou dinde) et l'efficacité du test semble correcte pour plusieurs espèces de rapaces diurnes, de Psittacidés, de Galliformes, de Sphéniscidés, d'Anatidés et de Gruidés. La sensibilité du test est évaluée à 95% et la spécificité à 80% (7). En revanche, ce test est incapable de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-*Aspergillus* chez les rapaces nocturnes et malgré les résultats plutôt encourageant sur d'autres espèces, il est parfois à l'origine de faux négatifs ou de la détection d'un faible taux d'anticorps chez des oiseaux cependant fortement atteints. Les raisons de ces

résultats ont déjà été évoquées auparavant. En conclusion un résultat positif avec cette technique suggère fortement une aspergillose alors qu'un résultat négatif ne permet pas de l'exclure. La répétition du test tous les un à deux mois lors de traitement permet d'évaluer l'efficacité de la thérapeutique (1, 17, 21, 24, 40).

La seconde technique ELISA a été mise en place plus récemment à l'Université de Médecine de Miami et diffère de la première par l'utilisation d'anticorps anti-Ig différents. Ces derniers sont produits en immunisant des lapins avec une préparation d'anticorps dérivés de sérums de plusieurs espèces de Falconidés, Sphénicidés et Psittacidés. Les résultats sont pour l'instant peu satisfaisants notamment chez les Psittacidés puisqu'une étude portant sur 7 Psittacidés ayant une aspergillose confirmée n'a permis la détection d'anticorps que chez un seul oiseau avec cette technique. Les auteurs supposent qu'il existe un manque de réactivité entre les anticorps anti-Ig et les anticorps des Psittacidés (21, 24, 40).

Dans le cadre d'une étude portant notamment sur l'efficacité de la détection des antigènes et des anticorps pour le diagnostic de l'aspergillose chez des canards (*Anas platyrhynchos* et *Tadorna cana*), une ELISA indirecte pour la détection des IgG a été mise en place. L'antigène utilisé pour ce test est une protéine basique de 55 kDa d'*Aspergillus* obtenue à partir du galactomannane et du glucane de la paroi du champignon. Ces antigènes ont été obtenus à partir de culture de d'*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* (18).

Le développement de techniques plus sensibles permet ainsi un diagnostic plus précoce de l'aspergillose mais il faut toutefois interpréter avec prudence les résultats négatifs (faux négatifs fréquents) et faiblement positifs, une étude ayant démontré chez des canards sains élevés à l'extérieur la présence systématique d'un faible taux d'anticorps anti-*Aspergillus* (18).

2. Détection d'antigènes

Il n'existe pas actuellement de sérologies antigènes développées et utilisées spécifiquement pour les oiseaux et les seules études réalisées concernent des tests utilisés

habituellement en médecine humaine. Ces méthodes feront l'objet d'une discussion dans la partie IV.

III. Etude expérimentale

L'aspergillose aviaire est une maladie difficile à diagnostiquer avec certitude et lorsque qu'un diagnostic de certitude est posé celui-ci est tardif. Cela a pour conséquence un traitement tardif et donc souvent peu efficace. Il est intéressant de mettre en place de nouveaux moyens diagnostiques de cette maladie chez les oiseaux permettant à la fois un diagnostic précoce et de certitude.

En médecine humaine, le test Platelia[®] est utilisé en routine pour le diagnostic de l'aspergillose invasive. Il s'agit d'un test ELISA détectant le galactomannane circulant d'*Aspergillus fumigatus*. Le but de cette étude est d'utiliser ce test avec des sérums d'oiseaux pour tenter de répondre à plusieurs questions :

- Le galactomannane est-il détectable dans le sérum des oiseaux atteints d'aspergillose ?
- La détection sérique du galactomannane est-elle pertinente pour diagnostiquer une aspergillose chez un oiseau ? Chez l'homme, le test Platelia[®] est utilisé pour le diagnostic de l'aspergillose invasive et présente au contraire peu d'intérêt pour diagnostiquer la présence de granulomes aspergillaires. En conséquence, nous pouvons nous interroger sur l'efficacité de la détection sérique du galactomannane chez des oiseaux présentant des signes compatibles avec une forme invasive d'aspergillose.
- La détection sérique du galactomannane est-elle pertinente pour suivre l'évolution d'une aspergillose chez un oiseau ?
- La détection sérique du galactomannane est-elle corrélée avec la détection d'anticorps anti-*Aspergillus* par électrosynérèse, méthode très utilisée chez les oiseaux ?

A. Matériels et méthodes

1. Constitution des échantillons

a) Choix des vétérinaires

Le choix des vétérinaires impliqués dans l'étude s'est principalement basé sur le nombre d'oiseaux traités par chacun et la possibilité pour ceux-ci de réaliser des prélèvements sanguins sur ces animaux. Considérant cette dernière contrainte, il nous a semblé préférable de ne pas impliquer des vétérinaires de parcs zoologiques puisque ceux-ci ne sont pas amenés à manipuler facilement une grande quantité d'oiseaux. Le choix s'est donc restreint aux vétérinaires praticiens spécialisés dans le traitement des nouveaux animaux de compagnie (NAC) et aux centres de soins de l'Union Française des Centres de Sauvegarde de la Faune Sauvage (UFCS). Sept vétérinaires spécialisés en NAC et dont la clientèle « oiseaux » représente 10 à 80% de la clientèle totale ont ainsi été contactés. De même deux centres de l'UFCS ont été impliqués : il s'agit du centre de l'Ecole Vétérinaire de Nantes et de celui de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort. Le centre de Nantes a été choisi parce qu'il reçoit de nombreux oiseaux marins et le centre d'Alfort pour des raisons de proximité. Parmi les 7 vétérinaires contactés, seuls 5 ont finalement participé à l'étude.

b) Choix des animaux

Il a été décidé d'inclure la plus grande variété d'espèces possible. Du fait de la prédominance des Psittacidés parmi les oiseaux de compagnie, cette famille est la plus représentée mais d'autres espèces dont des rapaces ont aussi été prélevées. Il n'a pas été précisé aux vétérinaires de spécificité de sexe ou d'âge, des oiseaux de tout âge, mâles et femelles ont donc été prélevés.

En revanche il a été demandé aux vétérinaires de prélever préférentiellement les oiseaux qu'ils suspectaient atteints d'aspergillose. Cette suspicion devait être basée sur les signes cliniques habituellement présents lors d'aspergillose, sur des résultats d'examens

complémentaires évocateurs notamment des radiographies et à partir de l'expérience personnelle de chaque vétérinaire. L'ensemble des symptômes présents lors d'aspergillose étaient rappelés dans la fiche A (annexe 1) fournie à chaque vétérinaire. Certains oiseaux ne présentant pas de signes cliniques ont cependant été prélevés pour un dépistage épidémiologique parce qu'ils appartenaient à des espèces sensibles à l'aspergillose ou parce qu'ils se trouvaient dans des situations « à risques » (oiseaux sauvages récupérés en centre de soins, oiseaux de contrebande, achat récent et stress dû au nouvel environnement...).

L'échantillon constitué à l'aide des vétérinaires praticiens et des centres de l'UFCS est donc un échantillon de convenance. Il n'est pas représentatif de l'ensemble des oiseaux puisque les vétérinaires ont été choisis arbitrairement et les critères de choix des oiseaux ont été suggérés mais aussi parce qu'il est très difficile de confirmer une aspergillose chez un oiseau ou d'affirmer qu'un oiseau est indemne d'aspergillose. La constitution d'une population d'oiseaux malades et d'une population d'oiseaux indemnes semble donc très difficile. Les résultats de l'étude conduite ici ne sont donc pas extrapolable à l'ensemble des oiseaux et ne s'appliquent qu'aux oiseaux constituant notre échantillon.

2. Prélèvements

a) Matériel

L'étude utilisant des techniques sérologiques, il était nécessaire d'obtenir des sérums et donc de faire des prélèvements sanguins sur les oiseaux. De manière générale, la prise de sang s'effectue avec des aiguilles de 20 à 26 G montées sur des seringues de 1 ou 2 mL. Le sang est ensuite stocké dans un tube sec en verre ou en plastique.

b) Réalisation des prélèvements

La majorité des oiseaux exceptés les Columbides, les Anatidés, les flamants et les ratites présente un aptérium cervical permettant une visualisation de la veine jugulaire et donc le prélèvement de sang au niveau de la veine jugulaire droite (plus développée que la gauche

chez les oiseaux). D'autres oiseaux ont été prélevés au niveau de la veine basilare ou de la veine métatarsienne médiale notamment les cygnes. Chez les oiseaux trop agités ou stressés, une anesthésie « flash » à l'isoflurane a été nécessaire.

c) Conservation

Une fois la prise de sang réalisée, le sang est immédiatement transféré dans un tube sec. Le tube est ensuite soit centrifugé par le vétérinaire après rétraction du caillot, soit envoyé tel quel au

Service de Parasitologie de l'ENVA où le sérum est séparé du caillot par centrifugation (1000 g pendant 5 minutes). Les prélèvements ont été envoyés par courrier postal sans conditionnement thermique particulier. Le sérum, conditionné dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL est conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à la réalisation de l'électrosynérèse puis congelé à -20°C jusqu'à la réalisation de l'ELISA.

3. Recueil des commémoratifs

Dans le but d'évaluer la pertinence des prélèvements par rapport aux critères de suspicion d'aspergillose mais aussi d'obtenir des informations permettant d'émettre des hypothèses sur l'efficacité du test Platelia® en fonction de certains commémoratifs, des fiches d'informations ont été fournies aux vétérinaires. Trois fiches ont été élaborées.

La fiche A (annexe 1) est la fiche de commémoratif complète à remplir lors de la réalisation du premier prélèvement sur un oiseau. Elle indique l'espèce, l'âge, le sexe, les conditions d'entretien (environnement, alimentation...), l'ensemble des symptômes ainsi que leur date d'apparition, les examens complémentaires et les traitements mis en place. La fiche B (annexe 2) ou fiche de « suivi » est la fiche à remplir si un oiseau est revu. Elle permet d'informer sur l'évolution de l'état de l'animal, les derniers examens complémentaires et les traitements actuels. La fiche C (annexe 3) est la fiche d'autopsie. Chaque prélèvement a systématiquement été accompagné d'une ou de plusieurs de ces fiches avec cependant des variations importantes dans les informations fournies, certaines fiches ne contenant que les coordonnées du vétérinaire et le nom du propriétaire de l'oiseau.

4. Traitement des prélèvements sériques

a) Recherche d'anticorps anti-*Aspergillus* par électrosynérèse

(1) Principe

L'électrosynérèse consiste à faire migrer dans un champ électrique des antigènes et des anticorps en sens opposé. La rencontre des molécules se manifeste par la formation d'un ou plusieurs arcs de précipitations visibles après coloration. Le support utilisé ici est une bande d'acétate de cellulose. Les éventuels anticorps (de type IgG) se chargent positivement et migrent vers la cathode. Les antigènes se chargent négativement et migrent vers l'anode. Pour l'électrosynérèse utilisée ici, 2 types d'antigènes sont utilisés : il s'agit des antigènes métabolique et somatique d'*Aspergillus fumigatus* qui permettent la détection d'anticorps précipitants.

(2) Protocole

L'électrosynérèse a été réalisée dans un délai inférieur à une semaine après réception des prélèvements.

Les bandes (SEBIA) sont rincées à l'eau distillée pendant 5 minutes puis imprégnées de tampon TRIS (un flacon TRIS barbital SEBIA de 75 mL et 825 mL d'eau distillée) pendant 10 minutes, le tout sous agitation (30 mouvements pendulaires pas minute). Elles sont ensuite essorées modérément sur du papier filtre.

Les dépôts sont effectués ensuite hors de la cuve de migration (SEBIA). Quinze microlitres de chaque sérum étudié et d'un témoin positif de chien (obtenu à partir d'un chien chez lequel une aspergillose a été confirmée à l'ENVA) sont déposés en un point du côté de l'anode. Trente microlitres d'antigène sont déposés sur une ligne du côté de la cathode. Pour chaque analyse, deux portoirs sont réalisés. Le premier en déposant l'antigène somatique

d'*Aspergillus fumigatus* et le second en déposant l'antigène métabolique d'*Aspergillus fumigatus*.

Une fois les dépôts effectués, les deux compartiments de la cuve de migration sont remplis avec du tampon TRIS et les portoirs sont insérés dans la cuve. La migration est faite pendant deux heures à une tension de 80 V.

Après la migration, les bandes sont lavées, sous agitation, 15 minutes dans la solution de lavage 1 (1 mL de RBS et 249 mL d'eau physiologique) puis 20 minutes dans la solution de lavage 2 (13 mL de tampon TRIS et 237 mL d'eau physiologique).

La dernière étape est la coloration : les bandes sont colorées sous agitation pendant 5 minutes dans une solution de bleu du Coomassie® (1,5 g de Coomassie® Brilliant Blue R-250 BIORAD, 250 mL de méthanol, 200 mL d'eau distillée, 50 mL d'acide acétique) puis rincées sous l'eau courante et décolorées dans deux bains successifs de décolorants (250 mL de méthanol, 200 mL d'eau distillée, 50 mL d'acide acétique) pendant quelques minutes sous agitation.

Les bandes sont déposées à plat sur une plaque de verre pour être lues.

(3) *Interprétation des résultats*

La présence d'anticorps précipitants anti-antigènes d'*Aspergillus fumigatus* se manifeste par la formation d'arcs de précipitation dont le nombre et l'intensité varient. Le test est valide s'il se forme au moins un arc net de précipitation pour le sérum témoin avec les antigènes somatiques et les antigènes métaboliques.

L'interprétation de la lecture des bandes est faite comme suit :

- absence d'arc de précipitation pour les antigènes somatiques et métaboliques : sérum « négatif » pour la présence d'anticorps.
- présence d'un faible ou très faible arc pour seulement l'un des deux types d'antigènes : sérum « intermédiaire » pour la présence d'anticorps.

- présence d'un faible arc pour chaque antigène ou présence d'un ou plusieurs arcs nets pour un ou les deux types d'antigènes : sérum « positif » pour la présence d'anticorps.

b) Recherche du galactomannane par ELISA Platelia® *Aspergillus*

(1) Principe

Cette technique est un dosage immuno-enzymatique sur phase solide dite ELISA sandwich direct permettant la détection semi-quantitative du galactomannane circulant dans le sérum. Ce test a un seuil de positivité fixé à 1 ng/mL de sérum testé. Un anticorps IgM est utilisé. Il s'agit d'un anticorps monoclonal, l'EBA-2, qui reconnaît les chaînes $\beta(1-5)$ galactofuranes du galactomannane. Son utilisation est double puisqu'il est fixé au fond des cupules de la microplaque et il est utilisé, marqué à la peroxydase, comme conjugué pour la détection des antigènes.

La première étape de la réaction consiste à traiter les sérums pour libérer les antigènes d'immunocomplexes circulants et précipiter les protéines sériques pouvant interférer lors de la réaction immuno-enzymatique. Pour cela, les sérums sont traités à la chaleur (100°C pendant 3 minutes) en présence d'une solution d'acide d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique).

Le sérum et le conjugué (anticorps EBA-2 couplé à la peroxydase) sont incubés ensemble dans les cupules de la microplaque dans lesquelles sont fixées des anticorps EBA-2. En présence d'antigène, ils se forment alors des complexes anticorps-antigène-anticorps+peroxydase.

Des lavages sont ensuite effectués permettant d'éliminer les anticorps non liés aux antigènes. La révélation est alors réalisée par addition d'un substrat permettant une réaction enzymatique avec la peroxydase. Cette réaction est ensuite arrêtée par ajout d'une solution d'acide sulfurique et le résultat est lu au spectrophotomètre.

(2) Protocole

Les sérums sont décongelés en étant placés dans un réfrigérateur (4°C) la veille de la réalisation de l'ELISA.

La notice du test Platelia[®] recommande de traiter 300 µL de sérum et de prélever après traitement 50 µL de surnageant (liquide occupant la zone supérieure du tube) pour la réaction sérologique. Parmi les sérums reçus dans le cadre de l'étude, moins de 10% étaient de volume suffisant. Nous avons donc essayé de préparer les sérums avec des volumes inférieurs, la condition à respecter étant l'obtention d'un minimum de 50 µL de surnageant pour effectuer la réaction sérologique normalement. Après essais, il s'est révélé que l'utilisation de 100 µL de sérum suffisait systématiquement à produire 50 µL de surnageant. Dans l'étape de préparation des sérums, la quantité de solution d'EDTA a donc été réduite proportionnellement (33 µL au lieu de 100 µL) pour conserver une concentration identique en antigènes. Toutes les solutions utilisées sont celles fournies avec le kit Platelia[®] *Aspergillus* BIORAD.

Un volume de 100 µL de chaque sérum est placé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Un volume de 33 µL de solution d'acide d'EDTA est introduit dans chaque tube. Le mélange est agité vigoureusement puis chauffé à 100°C pendant 3 minutes et enfin centrifugé 10 minutes à 10000 g. Quatre sérums témoins fournis avec le test sont préparés à l'identique. Il s'agit d'un sérum de contrôle négatif R3, deux sérums seuils R4 (1 ng/mL de galactomannane) et un sérum de contrôle positif R5 (10 ng/mL de galactomannane).

Une fois les sérums préparés, les cupules dans lesquels va se réaliser la réaction sont remplies de 50 µL de conjugué puis de 50 µL du surnageant de chaque sérum traité. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 90 minutes.

Après incubation, la plaque est lavée 5 fois avec une solution de tampon TRIS-NaCl de pH 7,4 contenant 1% de Tween 20 et 0,01% d'un conservateur, le thimesoral. Elle est ensuite séchée sur du papier absorbant.

L'activité enzymatique de la peroxydase est révélée par l'ajout dans chaque cupule de 200 µL d'une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) contenant de la tétraméthylbenzidine

diluée dans un tampon d'acide citrique, acétate de sodium, H₂O₂, DMSO de pH 5,2. La réaction est stoppée au bout de 30 minutes par l'ajout dans les cupules de 100 µL de solution d'arrêt d'acide sulfurique 1,5N.

La lecture est effectuée par un spectrophotomètre (THERMOLABSYSTEM) à la longueur d'onde de 620 nm. Pour chaque cupule, une densité optique (DO) est déterminée.

(3) Interprétation des résultats

Après détermination d'une valeur seuil (VS) correspondant à la moyenne des DO des cupules contenant le sérum seuil (R4), un index (I) est calculé pour chaque sérum testé comme suit :

$$I = \text{DO échantillon} / \text{VS}$$

Le but de ce calcul est de limiter les variations de DO inter-essais et inter-laboratoires.

Pour valider l'essai différents critères doivent être respectés :

- $0,3 \leq \text{VS} \leq 0,8$
- $I (\text{R5}) > 2,0$
- $I (\text{R3}) < 0,5$

Si ces critères sont respectés, les résultats peuvent être interprétés comme suit :

- $I < 1,0$: sérum « négatif » pour la présence de galactomannane
- $1,0 \leq I < 1,5$: sérum « intermédiaire » pour la présence de galactomannane
- $I \geq 1,5$: sérum « positif » pour la présence de galactomannane

B. Résultats

1. Résultats bruts

300 sérums nous ont été envoyés. Plusieurs sérums ont été exclus de l'étude. Certains étaient trop hémolysés, la présence d'hémoglobine dans le sérum pouvant interférer avec les réactions sérologiques. Quelques sérums, parce qu'ils étaient très peu hémolysés, ont cependant été utilisés. La seconde raison est la quantité trop faible de sérum recueilli. Comme nous l'avons vu précédemment nous avons pu diminuer jusqu'à 100 μL la quantité de sérum nécessaire à l'ELISA. Il fallait d'autre part 30 μL de sérum pour la réalisation de l'électrosynérèse. Un volume minimum de 130 μL était donc nécessaire.

Ce sont donc 140 sérums pour 133 oiseaux qui ont finalement été utilisés pour l'étude expérimentale. Pour 17 de ces sérums, aucun commémoratif n'a été envoyé et le résultat de l'électrosynérèse a été négatif. Il ne nous a donc pas été possible de savoir si les 17 oiseaux prélevés étaient ou non suspects d'aspergillose et ils ont donc été exclus de l'étude statistique. Parmi les 116 oiseaux restants, 38 ont été prélevés dans le cadre d'un dépistage c'est-à-dire qu'ils ne présentaient aucun signe clinique. Trente espèces sont représentées avec une majorité de Psittacidés (17 espèces), 6 espèces de rapaces et 7 espèces appartenant à diverses familles. Parmi les oiseaux dont on a pu préciser l'âge, on trouve 39 oiseaux âgés d'un an ou moins (les oiseaux dénommés juvéniles sont des oiseaux âgés de moins d'un an) et 38 oiseaux de plus d'un an.

Comme précisé auparavant, il est très difficile d'affirmer avec certitude un diagnostic d'aspergillose. Les signes cliniques et les examens complémentaires classiques (radiologie, endoscopie, hématologie...) ne permettent que de suspecter une aspergillose. Le seul examen complémentaire, outre l'ELISA, réalisé sur tous les oiseaux de l'étude est l'électrosynérèse. Nous avons donc décidé de classer les animaux en fonction d'une part du résultat de l'électrosynérèse et d'autre part des signes cliniques et autres examens complémentaires tout en sachant que nous n'avons pas pu constituer avec certitude un groupe d'oiseaux malades et un groupe d'oiseaux sains.

Les 116 oiseaux retenus ont donc été séparés en 3 groupes :

- le groupe A contient les oiseaux très probablement atteints d'aspergillose c'est-à-dire ceux pour lesquels l'électrosynérèse est positive et présentant des signes cliniques ou des résultats d'examens complémentaires compatible avec une aspergillose.
- le groupe B contient les oiseaux pour lesquels une aspergillose est possible. Il s'agit des oiseaux ne présentant aucun signe clinique (ou n'ayant aucun commémoratif) et dont l'électrosynérèse est positive, ceux dont l'électrosynérèse est intermédiaire (même en l'absence de commémoratifs) et ceux dont l'électrosynérèse est négative mais présentant des signes cliniques ou des résultats d'examens complémentaires permettant de suspecter une aspergillose.
- le groupe C contient les oiseaux dont l'électrosynérèse est négative et ne présentant aucun signe clinique.

Le groupe A (tableau 6) contient 30 oiseaux de 13 espèces différentes. Parmi ces oiseaux, 6 présentent un mauvais état général et 14 présentent des signes respiratoires (dyspnée, modification ou disparition de la voix, jetage nasal, lésions nasales). Pour 7 des oiseaux de ce groupe, les résultats d'examens complémentaires sont compatibles avec une aspergillose (anomalies sanguines, lésions radiographiques de l'appareil respiratoire, lésions visibles à l'endoscopie et mycologie).

Tableau 6 : présentation, symptômes et résultats des examens complémentaires du groupe A
(forte suspicion d'aspergillose)

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|----------|--------------|---|--|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Cacatoès soufré à crête orange (<i>Cacatua sulphurea citrinocristata</i>) | ND | bon | inappétence | | + | +/- (1,11) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>) | 30 ans | bon | amaigrissement, jetage nasal | | + | - (0,61) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, inappétence, boiterie de la patte gauche | hématocrite = 30% | + | + (3,63) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | mauvais | léthargie, dépression, modifications de la voix, vomissements, anorexie, diarrhées, selles vertes, biliverdinurie | | + | - (0,15) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | bon | ND | radio : opacité du sac aérien abdominal gauche | + | - (0,69) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | picage sévère, automutilation | | + | + (3,58) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|----------------|--------------|---|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 4 ans | ND | affaiblissement, dyspnée, respiration bec ouvert, râles inspiratoires | | + | + (1,66) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | ND | endoscopie : nodule sur sac aérien | + | +/- (1,17) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | crises convulsives | | + | - (0,52) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 1 an et 9 mois | bon | amaigrissement, jetage nasal, anorexie, ailes pendantes | | + | - (0,64) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dyspnée | | + | + (3,75) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 26 ans | bon | picage | | ++ | +/- (1,05) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | ND | picage | | + | - (0,56) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | plus de 8 ans | bon | boiterie de la patte gauche | | ++ | + (3,85) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 4 mois | bon | léthargie, orthopnée | | ++ | - (0,53) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|---------------|--------------|--|---|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet à calotte rouge (<i>Poicephalus gulielmi</i>) | ND | ND | disparition de la voix depuis 48h | | ++ | - (0,36) |
| Ara (<i>Ara</i> sp) | ND | mauvais | léthargie, diarrhées, biliverdinurie, urates jaunes | | + | + (4,7) |
| Pion de Maximilien (<i>Pionus maximiliani</i>) | ND | ND | dyspnée épisodique | | + | - (0,86) |
| Amazone verte (<i>Amazona agilis</i>) | adulte | mauvais | amaigrissement, léthargie, dyspnée | | + | +/- (1,13) |
| Amazone à front bleu (<i>Amazona aestiva</i>) | 4 ans | bon | dyspnée, modification de la voix, détresse respiratoire, jetage nasal | | ++ | - (0,53) |
| Faucon lanier (<i>Falco biarmicus</i>) | adulte | mauvais | amaigrissement, léthargie, perte de poids, dyspnée, vomissements, anorexie | leucocytose | + | +/- (1,24) |
| Cygne tuberculé (<i>Cygnus olor</i>) | moins d'un an | bon | plaie patagiale, boiterie droite | hyperprotéïnémie, hyperalbuminémie, endoscopie (puis autopsie) : aspergillome dans les sacs aériens | + | - (0,34) |
| Cygne tuberculé (<i>C. olor</i>) | plus d'un an | bon | fracture fermée de l'humérus droit | radio : opacité dans sac aérien abdominal gauche | + | - (0,51) |
| Cygne tuberculé (<i>C. olor</i>) | ND | bon | paralysie patte droite, arthrite genou droit | | + | - (0,25) |
| Mainate (<i>Gracula</i> sp) | adulte | ND | parésie bilatérale des pattes | | ++ | + (4,21) |
| Mainate (<i>Gracula</i> sp) | 12 ans | bon | dyspnée | | + | - (0,25) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|---------------|--------------|----------------------------|--|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Mainate (<i>Gracula</i> sp) | 18 ans | bon | dyspnée | | + | - (0,7) |
| Héron cendré (<i>Ardea cinerea</i>) | moins d'un an | bon | plaies par plomb à la face | | + | - (0,85) |
| Cigogne blanche (<i>Ciconia ciconia</i>) | ND | ND | difficultés respiratoires | | ++ | + (1,5) |
| Fou de Bassan (<i>Sula bassana</i>) | ND | ND | ND | mycologie sur granulome pulmonaire après autopsie : <i>Aspergillus fumigatus</i> | + | + (4,48) |

Abréviations utilisées

résultat électrosynérèse + = 1 arc de précipitation
 ++ = 2 arcs de précipitation
 résultat ELISA - = négatif
 +/- = intermédiaire
 + = positif

Dans ce groupe de 30 oiseaux tous positifs pour l'électrosynérèse, 9 ont un résultat positif à l'ELISA avec un index moyen de 3,48 (maximum : 4,70) et 5 un résultat intermédiaire. L'index moyen des oiseaux négatifs pour l'ELISA est de 0,52.

Parmi les 7 oiseaux ayant eu des résultats d'examens complémentaires compatibles avec une aspergillose, 2 ont un résultat positif à l'ELISA, 2 un résultat intermédiaire et 3 ont un résultat négatif malgré la visualisation endoscopique d'un aspergillome pour l'un et des images radiographiques suspectes pour les deux autres.

Le groupe B (tableau 7) contient 64 oiseaux de 18 espèces différentes. Parmi ces oiseaux, 22 présentent un mauvais état général, 12 présentent des signes respiratoires (dyspnée, modification ou disparition de la voix, jetage nasal, lésions nasales), 16 n'ont été prélevés que dans le cadre d'un dépistage et il n'y a aucun commémoratif pour 3 oiseaux.

Pour 3 des oiseaux de ce groupe les résultats d'examens complémentaires sont compatibles avec une aspergillose (lésions radiographiques de l'appareil respiratoire et lésions macroscopiques à l'autopsie).

Tableau 7 : présentation, symptômes et résultats des examens complémentaires du groupe B
(aspergillose possible)

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|----------|--------------|-----------------------|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>) | ND | ND | ND | | ++ | - (0,39) |
| Cacatoès à huppe jaune (<i>Cacatua galerita</i>) | juvénile | bon | dépistage | | + | - (0,66) |
| Grand Eclectus (<i>Eclectus roratus</i>) | juvénile | bon | dépistage | | + | + (1,78) |
| Grand Eclectus (<i>E. roratus</i>) | juvénile | ND | dépistage | | + | + (1,57) |
| Grand Eclectus (<i>E. roratus</i>) | ND | bon | dépistage | | + | - (0,31) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | dépistage | | + | - (0,8) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | dépistage | | + | + (2,43) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | dépistage | | + | + (4,61) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|----------|--------------|-----------------------|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | bon | dépistage | | + | +/- (1,39) |
| Espèce inconnue | ND | ND | ND | | + | - (0,46) |
| Espèce inconnue | ND | ND | ND | | + | + (1,65) |
| Cacatoès à huppe jaune (<i>C. galerita</i>) | juvénile | bon | dépistage | | +/- | +/- (1,22) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 1 an | bon | dépistage | | +/- | - (0,22) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | dépistage | | +/- | - (0,79) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | dépistage | | +/- | + (5,89) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 4 mois | bon | dépistage | | +/- | + (2,56) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | dépistage | | +/- | - (0,86) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | picage | | +/- | + (3,13) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | dépistage | | +/- | - (0,84) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|--------|--------------|--|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | bon | dépistage | | +/- | - (0,32) |
| Amazone oratrix (<i>Amazona ochrocephala oratrix</i>) | ND | mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, inappétence | | +/- | - (0,65) |
| Cacatoès rosalbin (<i>Eolophus roseicapillus</i>) | 8 mois | bon | rhinite, modifications des narines | | - | + (1,64) |
| Cacatoès corella (<i>Cacatua sanguinea sanguinea</i>) | ND | mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, anorexie | | - | +/- (1,2) |
| Grand Eclectus (<i>E. roratus</i>) | adulte | ND | picage | | - | + (1,92) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 15 ans | ND | amaigrissement, léthargie, gonflement des joues, uvéite | | - | + (4,11) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | mauvais | amaigrissement | | - | - (0,74) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | dyspnée, détresse respiratoire, narine droite bouchée, conjonctivite | radio : pas d'aérosacculite | - | - (0,9) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | mauvais | léthargie, disparition de la voix | radio : pas d'aérosacculite | - | - (0,26) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|---------------|--------------|--|--|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 2,5 ans | bon | anorexie | | - | - (0,72) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, inappétence, régurgitations | | - | + (4,38) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dépression, parésie | | - | - (0,51) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | plus de 6 ans | mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dépression, vomissements | | - | - (0,8) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 4 ans | bon | anémie, vomissements | | - | - (0,44) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 2 ans | ND | modification de la voix | radio : modification du bord postérieur du poumon et opacité d'un sac aérien | - | - (0,49) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | mauvais | cachexie, dépression, disparition de la voix, ataxie | radio : goutte rénale | - | - (0,49) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 20 ans | ND | granulomes nasaux | | - | - (0,86) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|----------|--------------|--|---|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | ND | radio : suspicion d'aérosacculite thoracique | - | + (1,78) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | bon | narine droite bouchée et remplie d'un magma nécrotique invasif | | - | - (0,5) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, inappétence | | - | + (6,53) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 2 ans | ND | amaigrissement, anémie, polyuro-polydipsie | | - | - (0,53) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | bon | abcès périoculaire droit | | - | - (0,31) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | bon | picage | | - | + (1,82) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | mauvais | amaigrissement, léthargie, anémie | | - | + (2,38) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | mauvais | amaigrissement, léthargie, dyspnée, détresse respiratoire, inappétence | autopsie : péricardite fibrineuse, aérosacculite fibrineuse | - | + (4,54) |
| Perroquet gris du Ghana (<i>Psittacus erithacus timneh</i>) | 3 mois | mauvais | amaigrissement, léthargie, inappétence | | - | + (2,35) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|----------------|--------------|---|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet à calotte rouge (<i>Poicephalus gulielmi</i>) | adulte | mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dépression | | - | + (4,57) |
| Perroquet youyou (<i>Poicephalus senegalus</i>) | 6 ans | bon | picage, cataracte | | - | - (0,6) |
| Ara bleu (<i>Ara ararauna</i>) | juvénile | mauvais | amaigrissement, déshydratation, anémie, plumage de mauvaise qualité | | - | + (3,72) |
| Ara militaire (<i>Ara militaris</i>) | adulte | bon | amaigrissement, diarrhée, graines non digérées dans les selles | | - | - (0,54) |
| Ara (<i>Ara</i> sp) | juvénile | mauvais | cachexie, convulsions | | - | - (0,42) |
| Ara (<i>Ara</i> sp) | plus de 15 ans | bon | bec déformé et troué | | - | - (0,49) |
| Amazone diadème (<i>Amazona autumnalis</i>) | adulte | bon | dyspnée intermittente | | - | - (0,34) |
| Amazone diadème (<i>A. autumnalis</i>) | ND | bon | dyspnée après l'effort | | - | - (0,77) |
| Amazone diadème (<i>A. autumnalis</i>) | ND | bon | picage | | - | - (0,66) |
| Amazone de Dufresne (<i>Amazona dufresniana</i>) | ND | mauvais | léthargie, dépression, anorexie | | - | - (0,61) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|----------|--------------|---|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Amazone à front jaune du Panama (<i>Amazona ochrocephala panamensis</i>) | juvénile | ND | dépôts cornéens bilatéraux | | - | - (0,65) |
| Amazone (<i>Amazona</i> sp) | ND | ND | abattement, troubles nerveux | | - | - (0,4) |
| Vautour de Rüppell (<i>Gyps rueppellii</i>) | ND | mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dépression, respiration ample et visible | radio : splénomégalie | - | - (0,73) |
| Busard des roseaux (<i>Circus aeruginosus</i>) | juvénile | mauvais | ND | | - | + (6,63) |
| Buse variable (<i>Buteo buteo</i>) | adulte | bon | fonte du cristallin de l'œil gauche | | - | - (0,3) |
| Faucon pèlerin (<i>Falco peregrinus</i>) | 5 mois | mauvais | amaigrissement, dyspnée, bruits inspiratoires, fatigue et essoufflements après l'effort, anorexie | | - | - (0,44) |
| Faucon pèlerin (<i>F. peregrinus</i>) | ND | mauvais | amaigrissement, affaiblissement, dyspnée, essoufflements | mycologie : <i>Candida albicans</i> | - | - (0,5) |
| Effraie des clochers (<i>Tyto alba</i>) | ND | mauvais | ND | | - | + (2,4) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|----------|--------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Guillemot de Troil (<i>Uria aalge</i>) | juvénile | mauvais | cachexie, diarrhée hémorragique | | - | - (0,55) |

Abréviations utilisées

résultat électrosynérèse - = aucun arc de précipitation
 +/- = 1 faible arc de précipitation pour un seul anticorps
 + = 1 arc de précipitation
 ++ = 2 arcs de précipitation
 résultat ELISA - = négatif
 +/- = intermédiaire
 + = positif

Dans ce groupe de 64 oiseaux, 43 sont négatifs pour l'électrosynérèse, 10 sont intermédiaires et 11 sont positifs ; 22 ont un résultat positif à l'ELISA avec un index moyen de 3,29 (maximum : 6,63) et 3 un résultat intermédiaire. L'index moyen des oiseaux négatifs pour l'ELISA est de 0,56.

Parmi les 3 oiseaux ayant eu des résultats d'examens complémentaires compatibles avec une aspergillose, 2 ont un résultat positif à l'ELISA et 1 oiseau présentant une opacité radiographique d'un sac aérien a un résultat négatif. Ces 3 oiseaux ont une électrosynérèse négative. Pour un 4^{ème} oiseau, une mycologie a été réalisé et a révélée une candidose, les résultats des tests sérologiques pour cet oiseau sont négatifs.

Le groupe C (tableau 8) contient 22 oiseaux de 7 espèces différentes. Ces oiseaux sont tous en bon état général et ne présentent aucun symptôme.

Tableau 8 : présentation et résultats des examens complémentaires du groupe C (aspergillose très peu probable)

| Espèce | Age | Sérologie | |
|---|----------|---|---|
| | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | - (0,42) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 13 ans | - | - (0,5) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | - (0,72) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | - | - (0,61) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | - (0,65) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 1 an | - | - (0,44) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | - | - (0,81) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | - (0,84) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | - | - (0,65) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | + (4,9) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | +/- (1,43) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | - | - (0,93) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | +/- (1,31) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | - | - (0,88) |
| Perroquet youyou (<i>Poicephalus senegalus</i>) | juvénile | - | + (2) |
| Amazone à front blanc (<i>Amazona albifrons</i>) | adulte | - | + (3,39) |
| Amazone diadème (<i>Amazona autumnalis</i>) | ND | - | - (0,39) |
| Amazone à front bleu (<i>Amazona aestiva</i>) | 3 ans | - | - (0,62) |

| Espèce | Age | Sérologie | |
|---|----------|---|---|
| | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Amazone (<i>Amazona</i> sp.) | juvénile | - | - (0,86) |
| Cygne tuberculé (<i>Cygnus olor</i>) | ND | - | - (0,42) |
| Cygne tuberculé (<i>C. olor</i>) | ND | - | - (0,64) |
| Goéland argenté (<i>Larus argentatus</i>) | adulte | - | - (0,41) |

Abréviations utilisées

résultat électrosynérèse - = aucun arc de précipitation

résultat ELISA - = négatif

+/- = intermédiaire

+ = positif

Parmi ces 22 oiseaux ayant tous un résultat négatif à l'électrosynérèse, 3 ont un résultat positif à l'ELISA et 2 un résultat intermédiaire. On peut remarquer que 4 de ces 5 oiseaux sont des juvéniles (âgés de moins d'un an).

Pour 6 oiseaux, plusieurs prélèvements ont pu être réalisés. Il s'agit de 2 Cygnes tuberculés (*Cygnus olor*), 1 Faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) et 3 Perroquets gris d'Afrique (*Psittacus erithacus erithacus*). Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : présentation, traitements et résultats des examens complémentaires des oiseaux
pour lesquels plusieurs prélèvements ont été fournis

| Espèce | Age | Date du prélèvement | Traitement | Sérologie | |
|---|---------------|---------------------|---|---|---|
| | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>) | 6 mois | 13/09/2003 | à partir du 30/08/2003 : Fluconazole pendant 1 mois | - | - (0,72) |
| | | 14/10/2003 | | +/- | - (0,32) |
| | | 05/04/2004 | | - | +/- (1,48) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | | 29/03/2004 | | +/- | - (0,86) |
| | | 14/06/2004 | | + | - (0,48) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 30 ans | 16/07/2003 | | + | - (0,61) |
| | | 08/03/2004 | | - | - (0,32) |
| Faucon pèlerin (<i>Falco peregrinus</i>) | 5 mois | 30/10/2003 | Itraconazole (10mg/kg/12h) et Enrofloxacin | - | - (0,44) |
| | | 17/11/2003 | Itraconazole, Enrofloxacin et Terbinafine PO, Enilconazole et Enrofloxacin en fumigation, Kétoprofen IM | - | + (4,66) |
| Cygne tuberculé (<i>Cygnus olor</i>) | moins d'un an | 14/04/2004 | Enrofloxacin 15mg/kg/12h 10 jours | + | - (0,34) |
| | | 27/04/2004 | aucun traitement | +++ | - (0,15) |
| Cygne tuberculé (<i>C. olor</i>) | plus d'un an | 15/04/2004 | Enrofloxacin 15mg/kg/12h 10 jours | + | - (0,51) |
| | | 02/06/2004 | aucun traitement | + | - (0,79) |

Abréviations utilisées

IM = intramusculaire ; PO = per os

résultat électrosynérèse - = aucun arc de précipitation

+/- = 1 faible arc de précipitation pour un seul anticorps

+ = 1 arc de précipitation

+++ = 3 arcs de précipitation

résultat ELISA - = négatif

+/- = intermédiaire

+ = positif

On peut observer qu'il n'y a qu'un résultat positif à l'ELISA. Il concerne la sérologie de suivi d'un Faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) recevant un traitement complet contre l'aspergillose. Le second oiseau dont on connaît le traitement contre l'aspergillose est un Perroquet gris d'Afrique (*P. erithacus erithacus*) dont la troisième sérologie ELISA fournit un résultat intermédiaire.

Il nous a semblé intéressant de présenter dans le tableau 10 tous les oiseaux dont l'index Platelia® est supérieur ou égal à 1,5. Trente cinq oiseaux de 13 espèces différentes sont concernés. Parmi ces oiseaux, 13 présentent un mauvais état général, 6 présentent des signes respiratoires (dyspnée, modification ou disparition de la voix, jetage nasal, lésions nasales), 4 ne présentent que du picage, 8 n'ont été prélevés que dans le cadre d'un dépistage et il n'y a aucun commémoratif disponible pour un oiseau. Pour 4 des oiseaux de ce groupe, les résultats d'examens complémentaires sont compatibles avec une aspergillose (lésions radiographiques de l'appareil respiratoire, lésions macroscopiques à l'autopsie, anomalies de la numération-formule sanguine et mycologie).

Tableau 10 : présentation, symptômes et résultats des examens complémentaires des oiseaux dont l'index Platelia® est supérieur ou égal à 1,5

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|----------|--------------|---|-------------------------------------|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Cacatoès rosalbin (<i>Eolophus roseicapillus</i>) | 8 mois | Bon | rhinite, modifications des narines | | - | + (1,64) |
| Grand Eclectus (<i>Eclectus roratus</i>) | juvénile | Bon | dépistage | | + | + (1,78) |
| Grand Eclectus (<i>E. roratus</i>) | juvénile | ND | dépistage | | + | + (1,57) |
| Grand Eclectus (<i>E. roratus</i>) | adulte | ND | picage | | - | + (1,92) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>) | 15 ans | ND | amaigrissement, léthargie, gonflement des joues, uvéite | | - | + (4,11) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|--|----------|--------------|---|--|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, inappétence, boiterie de la patte gauche | hématocrite = 30% | + | + (3,63) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, inappétence, régurgitations | | - | + (4,38) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | Bon | picage sévère, automutilation | | + | + (3,58) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Bon | dépistage | | + | + (2,43) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 4 ans | ND | affaiblissement, dyspnée, respiration bec ouvert, râles inspiratoires | | + | + (1,66) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | Bon | ND | radio : suspicion d'aérosacculite thoracique | - | + (1,78) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Bon | dépistage | | +/- | + (5,89) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Bon | dépistage | | + | + (4,61) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Mauvais | amaigrissement, déshydratation, léthargie, inappétence | | - | + (6,53) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | 4 mois | Bon | dépistage | | +/- | + (2,56) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'examens complémentaires | Sérologie | |
|---|---------------|--------------|--|---|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Bon | dépistage | | - | + (4,9) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Bon | picage | | - | + (1,82) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Bon | picage | | +/- | + (3,13) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | ND | Mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dyspnée | | + | + (3,75) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | juvénile | Mauvais | amaigrissement, léthargie, anémie | | - | + (2,38) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | plus de 8 ans | Bon | boiterie de la patte gauche | | ++ | + (3,85) |
| Perroquet gris d'Afrique (<i>P. erithacus erithacus</i>) | adulte | Mauvais | amaigrissement, léthargie, dyspnée, détresse respiratoire, inappétence | autopsie : péricardite fibrineuse, aérosacculite fibrineuse | - | + (4,54) |
| Perroquet gris du Ghana (<i>Psittacus erithacus timneh</i>) | 3 mois | Mauvais | amaigrissement, léthargie, inappétence | | - | + (2,35) |
| Perroquet à calotte rouge (<i>Poicephalus gulielmi</i>) | adulte | Mauvais | cachexie, déshydratation, léthargie, dépression | | - | + (4,57) |
| Perroquet youyou (<i>Poicephalus senegalus</i>) | juvénile | Bon | dépistage | | - | + (2) |

| Espèce | Age | Etat général | Motif de consultation | Résultats d'exams complémentaires | Sérologie | |
|--|----------|--------------|---|--|---|---|
| | | | | | Recherche d'anticorps (électrosynérèse) | Recherche de galactomannane (ELISA) (index Platelia®) |
| Ara bleu (<i>Ara ararauna</i>) | juvénile | Mauvais | amaigrissement, déshydratation, anémie, plumage de mauvaise qualité | | - | + (3,72) |
| Ara (<i>Ara</i> sp) | ND | Mauvais | léthargie, diarrhées, biliverdinurie, urates jaunes | | + | + (4,7) |
| Amazone à front blanc (<i>Amazona albifrons</i>) | adulte | Bon | ND | | - | + (3,39) |
| Busard des roseaux (<i>Circus aeruginosus</i>) | juvénile | Mauvais | ND | | - | + (6,63) |
| Faucon pèlerin (<i>Falco peregrinus</i>) | 6 mois | Mauvais | faiblesse, dyspnée, essoufflements, anorexie | | - | + (4,66) |
| Effraie des clochers (<i>Tyto alba</i>) | ND | Mauvais | ND | | - | + (2,4) |
| Mainate (<i>Gracula</i> sp) | adulte | ND | parésie bilatérale des pattes | | ++ | + (4,21) |
| Fou de Bassan (<i>Sula bassana</i>) | ND | ND | ND | Mycologie sur granulome pulmonaire après autopsie : <i>Aspergillus fumigatus</i> | + | + (4,48) |
| Cigogne blanche (<i>Ciconia ciconia</i>) | ND | ND | difficultés respiratoires | | ++ | + (1,5) |
| Espèce inconnue | ND | ND | ND | | + | + (1,65) |

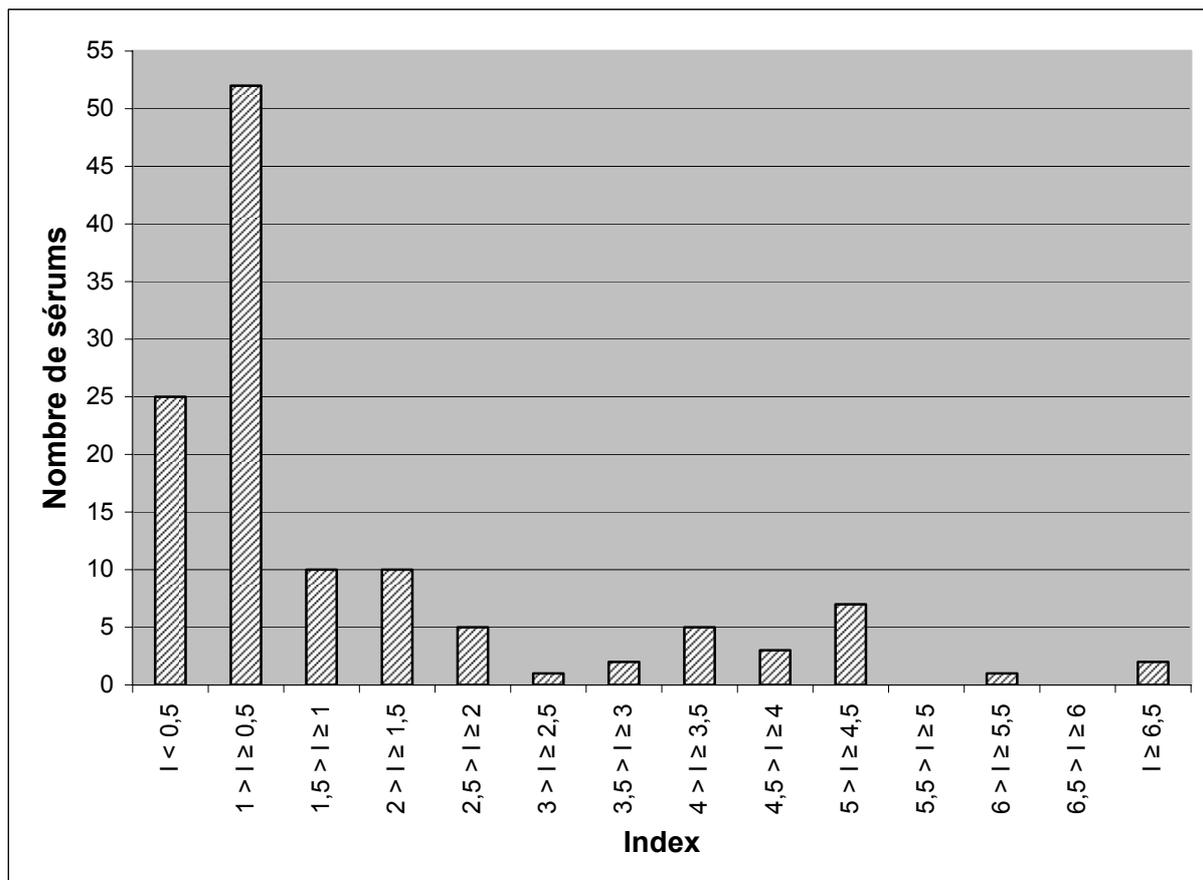
Abréviations utilisées

résultat électrosynérèse - = aucun arc de précipitation
 +/- = 1 faible arc de précipitation pour un seul anticorps
 + = 1 arc de précipitation
 ++ = 2 arcs de précipitation
 résultat ELISA + = positif

Dans ce groupe de 35 oiseaux, la moyenne de l'index Platelia[®] est de 3,39 (maximum : 6,63). Quatorze ont une électrosynérèse positive dont 3 avec 2 arcs de précipitation pour chaque antigène et 3 ont une électrosynérèse intermédiaire.

Si on présente la répartition des sérums en fonction de leur index (figure 12), on observe deux pics. Le premier se situe vers les index compris entre 0 et 2,5. Il est le plus important, avec un maximum de 52 sérums dont l'index est compris entre 0,5 et 1. Le second, beaucoup plus faible, se situe vers les index compris entre 3,5 et 5. Il concerne 15 sérums. Le maximum, de 7, concerne les sérums dont l'index est compris entre 4,5 et 5. Lorsqu'on s'intéresse uniquement aux sérums positifs, on remarque alors qu'il existe deux catégories d'oiseaux. La première comprend ceux dont les index sont compris entre 2,5 et 3,5 et la seconde ceux pour lesquels il est compris entre 3,5 et 5.

Figure 12 : répartition des sérums en fonction de leur index Platelia[®]



2. Etude statistique des résultats

A partir de ces résultats, il nous a semblé intéressant pour notre échantillon de calculer la sensibilité (aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un individu infecté), la spécificité (aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un individu indemne) et les valeurs prédictives positive (proportion des vrais positifs parmi l'ensemble des réponses positives fournies par un test) et négative (proportion des vrais négatifs parmi l'ensemble des réponses négatives fournies par un test) du test Platelia[®]. Pour cela nous avons considéré que les oiseaux atteints d'aspergillose sont ceux pour lesquels l'électrosynérèse est positive et qui présentent des signes cliniques ou des résultats d'examens complémentaires compatibles avec une aspergillose.

Pour ces calculs nous avons utilisé les oiseaux du groupe A (forte suspicion d'aspergillose) et du groupe C (aspergillose très peu probable) considéré comme le groupe témoin et nous avons considéré les oiseaux positifs à l'ELISA comme ceux dont l'index Platelia[®] est supérieur ou égal à 1,5. Ceux dont l'index est inférieur à 1,5 sont considérés négatifs (tableau 11).

Tableau 11 : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative du test Platelia[®] lorsque les oiseaux positifs ont un index supérieur ou égal à 1,5

| | Groupe A (forte suspicion d'aspergillose) | Groupe C (témoins) | Total | |
|-----------------------------|---|--------------------|-------|---------|
| Positif (I ≥ 1,5) | 9 | 3 | 12 | Se=30% |
| Négatif (I < 1,5) | 21 | 19 | 40 | Sp=86% |
| Total | 30 | 22 | 52 | VPP=75% |
| | | | | VPN=48% |

Calculs

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} ; Sp = \frac{VN}{VN + FP} ; VPP = \frac{VP}{VP + FP} ; VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Abréviations utilisées

Se = sensibilité ; Sp = spécificité ; VPP = valeur prédictive positive ; VPN = valeur prédictive négative
VP = vrais positifs ; FP = faux positifs ; VN = vrais négatifs ; FN = faux négatifs

On obtient ainsi, pour le test Platelia[®] chez les oiseaux de l'échantillon, une sensibilité de 30% et une spécificité de 86%.

Il est aussi possible d'inclure les oiseaux dont l'index Platelia[®] est compris entre 1 et 1,5 dans la catégorie des oiseaux positifs, on calcule alors de nouvelles valeurs (tableau 12).

Tableau 12 : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative du test Platelia[®] lorsque les oiseaux positifs ont un index supérieur ou égal à 1

| | Groupe A (forte suspicion d'aspergillose) | Groupe C (témoins) | Total | |
|--|---|--------------------|-------|---------|
| Positif ($I \geq 1$) | 14 | 5 | 19 | Se=47% |
| Négatif ($I < 1$) | 16 | 17 | 33 | Sp=77% |
| Total | 30 | 22 | 52 | VPP=74% |
| | | | | VPN=52% |

Abréviations utilisées

Se = sensibilité ; Sp = spécificité ; VPP = valeur prédictive positive ; VPN = valeur prédictive négative

Dans ce cas, la sensibilité se trouve améliorée (47%) au détriment de la spécificité (77%).

Parmi les 116 oiseaux inclus dans l'étude on retrouve 61 perroquets gris d'Afrique de la sous-espèce *P. erithacus erithacus*. Il nous a donc semblé intéressant de calculer la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative du test Platelia[®] dans cet échantillon et pour cette espèce lorsque que les oiseaux positifs ont un index supérieur ou égal à 1,5 puis à 1 (tableau 13).

Tableau 13 : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative du test Platelia[®] pour *P. erithacus erithacus* pour 2 seuils de positivité

| | <i>P. erithacus erithacus</i> du groupe A (forte suspicion d'aspergillose) | <i>P. erithacus erithacus</i> du groupe C (témoins) | Total | |
|--|--|---|-------|---------|
| Positif ($I \geq 1,5$) | 5 | 1 | 6 | Se=36% |
| Négatif ($I < 1,5$) | 9 | 13 | 22 | Sp=93% |
| Total | 14 | 14 | 28 | VPP=83% |
| | | | | VPN=59% |

| | <i>P. erithacus erithacus</i> du groupe A (forte suspicion d'aspergillose) | <i>P. erithacus erithacus</i> du groupe C (témoins) | Total | |
|--|--|---|-------|---------|
| Positif ($I \geq 1$) | 7 | 3 | 10 | Se=50% |
| Négatif ($I < 1$) | 7 | 11 | 18 | Sp=79% |
| Total | 14 | 14 | 28 | VPP=70% |
| | | | | VPN=61% |

Abréviations utilisées

Se = sensibilité ; Sp = spécificité ; VPP = valeur prédictive positive ; VPN = valeur prédictive négative

On obtient ainsi, pour le test Platelia[®] chez les Perroquet gris d'Afrique (*P. erithacus erithacus*) de notre échantillon, une sensibilité de 36% (ou 50%) et une spécificité de 93% (ou 79%).

Il nous a semblé intéressant de savoir si les résultats des deux tests sérologiques utilisés étaient indépendants. Pour cela, nous avons réalisé un test d'indépendance (dérivé du test du χ^2). L'hypothèse H_0 est l'hypothèse nulle selon laquelle le résultat de l'ELISA pour un sérum est indépendant du résultat de l'électrosynérèse. A partir des résultats observés présentés dans le tableau 14 et en utilisant l'hypothèse H_0 , il est possible de calculer les résultats théoriques présentés dans le tableau 15.

Tableau 14 : répartition observée des résultats de l'ELISA et de l'électrosynérèse

| | | électrosynérèse | | |
|-------|---|-----------------|----|-----|
| | | + | - | |
| ELISA | + | 14 | 21 | 35 |
| | - | 30 | 58 | 88 |
| | | 44 | 79 | 123 |

Tableau 15 : répartition théorique des résultats de l'ELISA et de l'électrosynérèse

| | | électrosynérèse | | |
|-------|---|----------------------|----------------------|-----|
| | | + | - | |
| ELISA | + | $44 * 35 / 123 = 13$ | $79 * 35 / 123 = 22$ | 35 |
| | - | $44 * 88 / 123 = 31$ | $79 * 88 / 123 = 57$ | 88 |
| | | 44 | 79 | 123 |

Le calcul du χ^2 est alors le suivant :

$$\chi^2 = \frac{(14-13)^2}{13} + \frac{(21-22)^2}{22} + \frac{(30-31)^2}{31} + \frac{(58-57)^2}{57} = 0,17$$

Le degré de liberté est de 1 (ddl = (nombre de colonnes - 1)*(nombre de lignes - 1)). Si on choisit alors un intervalle de confiance à 95% ($\alpha = 5\%$), la valeur du χ^2 donné par les tables est de 3,84. La valeur de χ^2 que l'on obtient est inférieure à 3,84, l'hypothèse nulle est donc vérifiée. Les résultats des deux tests sont donc indépendants ce qui signifie qu'un sérum dont le résultat à l'électrosynérèse est positif a autant de chance d'avoir un résultat positif que négatif à l'ELISA et réciproquement.

IV. Discussion

A. Etude de la population examinée

Trente espèces d'oiseaux appartenant à 11 familles ont été intégrées à l'étude. La diversité est donc très importante. Une espèce est cependant majoritairement représentée, il s'agit du Perroquet gris d'Afrique (*P. erithacus erithacus*) avec 61 spécimens pour 116 oiseaux au total (53%). Le test Platelia[®] détecte le galactomannane, quelle que soit l'espèce animale dans laquelle se développent les lésions d'aspergillose. En revanche on sait que toutes les espèces n'ont pas la même sensibilité à l'aspergillose, on peut donc supposer que la réaction immunitaire et donc le taux circulant de galactomannane est variable suivant les espèces lors d'aspergillose. Pour une première évaluation du test Platelia[®], l'utilisation d'une population variée semble intéressante. Cela permet en effet de cibler les espèces chez lesquelles le test paraît plus sensible et spécifique et dans un second temps de restreindre l'étude à une population mieux ciblée en ne s'intéressant qu'à une seule famille ou espèce ainsi qu'à une catégorie d'âge précise. On sait en effet que suivant l'âge, les oiseaux ne développent pas forcément la même forme d'aspergillose.

Suivant les vétérinaires et malgré les fiches de commémoratifs fournies, les critères de prélèvements des oiseaux ont été assez variables puisque certains vétérinaires nous ont envoyé des sérums d'oiseaux sains ou présentant des symptômes peu évocateurs alors que d'autres ne nous ont envoyé que des sérums d'oiseaux qu'ils suspectaient fortement d'être atteints d'aspergillose. Il aurait été probablement plus judicieux soit de se restreindre à un seul vétérinaire soit de réaliser systématiquement d'autres examens complémentaires comme la radio et la numération-formule sanguine pour affiner la suspicion d'aspergillose.

B. Réalisation des tests sérologiques

La réalisation des tests sérologiques est soumise à certaines conditions. Pour la réalisation du test Platelia[®], il est déconseillé d'utiliser un sérum hémolysé, or dans notre cas un certain nombre de sérums l'étaient et n'ont donc pas pu être utilisés. De même un volume minimal de 100 µL de sérum est nécessaire pour la réalisation de l'ELISA (plus 30 µL pour

l'électrosynérèse). Il est donc nécessaire de prélever un minimum de 200 µL de sang (hématocrite normal = 50%). Si on considère qu'on ne peut pas prélever plus de 10% du volume sanguin d'un oiseau (volume sanguin = 10% du poids de l'oiseau), un volume de prélèvement de 200 µL correspond donc à un oiseau de 20 g. Deux conditions s'imposent donc : le poids de l'oiseau doit être supérieur 20 g (voir d'avantage si d'autres analyses sanguines sont nécessaires) et le prélèvement doit être de qualité (aiguille de diamètre suffisant et seringue de volume réduit pour éviter une hémolyse). Dans notre cas, moins de 50% des sérums reçus ont pu être utilisés à cause de volumes trop faibles ou de sérums hémolysés. D'autre part, on ne connaît pas les effets de la conservation (congélation, décongélation, réfrigération...) ainsi que du transport sur les résultats des tests.

L'électrosynérèse est un test dont la réalisation est facile et ne nécessite pas de matériel très coûteux. Les résultats sont obtenus en 4 heures et il est possible du fait du coût relativement faible des bandes d'acétate de cellulose de ne réaliser le test que pour un seul sérum. En revanche, la réalisation du test Platelia® (environ 4 heures) est plus complexe nécessitant un matériel varié et onéreux (centrifugeuse, incubateur, spectrophotomètre...). D'autre part, le kit Platelia® *Aspergillus* étant très cher (environ 500 € pour 96 sérums dont les 4 témoins), il est nécessaire d'utiliser systématiquement des barrettes entières et de préférence plusieurs pour économiser les témoins. Il faut donc attendre d'avoir plusieurs sérums pour faire l'ELISA, le délai peut donc être fortement allongé.

Dans un second temps, on peut s'interroger sur la pertinence de l'utilisation de l'électrosynérèse comme test de comparaison avec l'ELISA, le test d'indépendance réalisé montre en effet une indépendance de ces deux tests sur la population étudiée ici. Actuellement, aucune étude n'a été réalisée sur l'efficacité et les qualités intrinsèques (sensibilité et spécificité) de l'électrosynérèse chez les oiseaux. Il aurait été probablement plus judicieux de réaliser sur chaque oiseau une batterie d'examen complémentaires pour essayer de confirmer les cas d'aspergilloses et mesurer ainsi de manière plus pertinente l'intérêt du test Platelia®. Nous avons en effet constitué des groupes d'oiseaux sur des critères cliniques qui ne permettent pas de façon certaine de savoir quels sont les oiseaux sains et quels sont les oiseaux atteints. Comme nous l'avons évoqué auparavant, Redig (43) recommande d'associer endoscopie, culture à partir d'un écouvillonnage profond de la trachée et sérologie anticorps. Cependant, certains examens complémentaires comme l'endoscopie sont peu disponibles et trop invasifs nécessitant une anesthésie générale. La culture à partir d'un écouvillonnage

profond de la trachée est d'autre part un examen controversé : risque de contamination du prélèvement, faux négatifs si la trachée n'est pas atteinte. En revanche, La PCR semble une voie prometteuse. Des essais sur des autruches ont ainsi permis de définir un seuil de détection de l'ADN d'*Aspergillus fumigatus* de 1 pg (17). Pour un vétérinaire praticien ne disposant pas d'un endoscope mais seulement d'un équipement de base (appareil à radiographies, microscope) on pourra donc proposer l'association de la radiologie, de la numération-formule sanguine, de l'électrosynérèse et de l'ELISA Platelia®.

C. Interprétation des résultats

Parmi les 123 prélèvements (correspondant à 116 oiseaux) qui entrent dans l'étude, 35 ont donné un résultat positif au test Platelia®. La détection de l'antigène galactomannane d'*Aspergillus fumigatus* est donc possible dans le sérum des oiseaux. Pour au moins un de ces oiseaux, un Fou de bassan (*Sula bassana*), une culture à partir d'un granulome pulmonaire a permis d'isoler *Aspergillus fumigatus* et donc de confirmer avec certitude une aspergillose. Le test Platelia® peut donc détecter du galactomannane sérique chez des oiseaux atteints d'aspergillose.

Le test Platelia® est un test semi-quantitatif. La densité optique est d'autant plus élevée que la concentration de galactomannane est importante ; le sérum seuil servant à calculer les index a une concentration de 1 ng/mL en galactomannane. Plus l'index est élevé et plus la concentration en antigènes du sérum est élevée. On sait d'autre part que le sérum positif servant à la validation du test a une concentration de 10 ng/mL en galactomannane. Grâce à l'index de ce sérum et à partir des index des sérums étudiés, il est possible d'estimer la concentration en galactomannane de chaque sérum. La moyenne des index des 35 sérums positifs est de 3,39 (environ 11,2 ng/mL de galactomannane) et 18 de ces sérums ont un index supérieur à 3,5. Il semble donc que lorsque du galactomannane est présent dans le sérum des oiseaux, il y soit à une concentration importante. On peut supposer que le système immunitaire tant qu'il est encore compétent permet de maintenir un taux relativement faible d'antigène mais dès lors qu'il est surpassé, l'immunosuppression devient très importante et le taux circulant de galactomannane explose. Cinquante six pour cent des oiseaux dont l'index est supérieur à 3,5 sont en mauvais état général alors que seulement 18% des oiseaux dont l'index est compris entre 1,5 et 3,5 le sont.

Rappelons tout d'abord que l'échantillon étudié ici n'est pas représentatif de l'ensemble des oiseaux et que la constitution des groupes d'oiseaux atteints et témoins s'est faite à partir de critères cliniques et des résultats de l'électrosynérèse. Rien ne permet d'affirmer avec certitude que tous les oiseaux du groupe A sont atteints et que tous les oiseaux du groupe C sont indemnes. Cependant, en admettant que les oiseaux ayant au moins un arc de précipitation à l'électrosynérèse et présentant des signes cliniques ou des examens complémentaires compatibles avec une aspergillose sont effectivement atteints d'aspergillose et que ceux ne présentant aucun signe cliniques et ayant un résultat négatif à l'électrosynérèse sont indemnes, il nous a été possible d'évaluer les paramètres du test Platelia[®] pour notre échantillon. Pour les oiseaux étudiés ici, la sensibilité du test Platelia[®] est de 30% (36% chez *P. erithacus erithacus*) contre 72,4% chez l'homme (14) et la valeur prédictive négative de 52% (59% chez *P. erithacus erithacus*) (les oiseaux positifs sont ceux ayant un index supérieur ou égal à 1,5). Il existe donc beaucoup de faux négatifs parmi les oiseaux étudiés. Le test Platelia[®] ne semblerait donc pas intéressant pour diagnostiquer une aspergillose s'il n'est pas couplé à l'utilisation d'autres examens complémentaires. Très peu de données existent actuellement sur l'efficacité du test Platelia[®] chez les oiseaux. Une évaluation du test chez des faucons a donné des résultats similaires aux nôtres. Chez beaucoup de ces rapaces pour lesquels l'aspergillose a été systématiquement confirmée par endoscopie, cytologie ou culture, le test Platelia[®] s'est révélé négatif (4).

Le test Platelia[®] est capable de détecter du galactomannane à une concentration de 1ng/mL. Il semble donc que les concentrations sériques de galactomannane chez les oiseaux atteints d'aspergillose soient fréquemment inférieures à 1 ng/mL. Cela pourrait s'expliquer en partie par la vascularisation faible de certains organes atteints. On sait en effet que les sacs aériens sont très peu vascularisés, il n'y aurait donc qu'un faible passage du galactomannane dans le sang. Cette hypothèse est celle avancée par les auteurs de l'étude sus-mentionnée (4). Une électrosynérèse positive signifie qu'il y a eu une stimulation antigénique récente puisqu'il semblerait que les anticorps précipitant détectés aient une demi-vie plasmatique courte. Mais on sait aussi que la demi-vie du galactomannane est brève. Lors d'électrosynérèse positive et d'ELISA négative, il n'est donc pas possible de savoir si il n'y a plus de galactomannane circulant ou si son taux est inférieur à 1 ng/mL (21, 24).

La spécificité du test Platelia[®] dans notre étude est de 86% et la valeur prédictive positive de 75% (respectivement 93% et 83% chez *P. erithacus erithacus*). Il y a donc peu de faux positifs dans l'échantillon étudié. Chez l'homme des faux positifs ont été expliqués par des réactions positives de l'ELISA avec l'acide lipotéique de *Bifidobacterium*. D'autre part *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces* possèdent du galactomannane qui peut donner un résultat positif à l'ELISA (6, 32). Certains de ces champignons sont retrouvés occasionnellement chez les oiseaux. Le test Platelia[®] permet donc de détecter le galactomannane circulant mais pas de diagnostiquer une aspergillose. Une étude a d'autre part montrer qu'une faible antigénémie serait commune chez des oiseaux sains (21, 24). Dans une autre étude, les auteurs considèrent que seule une antigénémie (l'antigène détecté est une protéine basique de 55 kDa d'*Aspergillus* obtenue à partir du galactomannane et du glucane de la paroi du champignon) supérieure ou égale à 65 ng/mL est indicative d'une aspergillose invasive chez les oiseaux (18). Aucun des sérums étudiés ici n'a révélé une concentration aussi élevée en galactomannane. Un test Platelia[®] positif devrait donc être interprété en tenant compte des signes cliniques de l'oiseau et des autres examens complémentaires et peut-être en fonction de la valeur de l'index.

Trop peu d'oiseaux ont été prélevés dans le cadre d'un suivi. Il n'est donc pas possible d'évaluer l'intérêt du test Platelia[®] pour le suivi d'oiseaux atteints d'aspergillose. En revanche, de nombreux oiseaux, parce qu'ils appartenaient à des espèces sensibles ou parce qu'ils se trouvaient dans des situations à risques, ont été prélevés pour un dépistage. Huit oiseaux sur les 38 prélevés uniquement pour un dépistage ont un résultat positif au Platelia[®] avec un index moyen de 3,23. Ils sont tous âgés de moins d'un an. Quatre de ces oiseaux ont un résultat d'électrosynérèse positif. Le test Platelia[®] permet donc de détecter certains cas d'aspergillose avant l'apparition des premiers symptômes. Il serait maintenant intéressant de savoir si ces oiseaux développent toujours une aspergillose ultérieurement ainsi que le délai entre la détection de galactomannane et l'apparition des premiers signes cliniques.

Chez l'homme, l'aspergillose peut prendre deux formes : localisée avec la formation dans un organe d'un aspergillome ou invasive avec atteinte disséminée d'un ou plusieurs organes. L'indication du test Platelia[®] est la détection de l'aspergillose invasive humaine. En revanche, la détection d'anticorps précipitants est surtout intéressante pour la mise en évidence d'aspergillome puisque des anticorps précipitants sont trouvés chez 90 à 100% des patients présentant un aspergillome alors que seulement 57% des patients atteints

d'aspergillose invasive en présentent (17). Chez les oiseaux, on peut envisager cette distinction puisqu'on connaît des formes d'aspergillose se manifestant par la formation d'aspergillomes souvent localisés à l'appareil respiratoire et d'autres caractérisées par une atteinte disséminée. On peut calculer les proportions de résultats positifs à l'ELISA et à l'électrosynérèse pour d'une part les oiseaux présentant des signes respiratoires (dyspnée, modification de la voix, jetage, nasal...) et d'autre part les oiseaux en mauvais état général. Cinquante quatre pour cent des oiseaux avec des troubles respiratoires ont une électrosynérèse positive, seuls 23% ont un ELISA positif. En revanche 21% des oiseaux en mauvais état général ont une électrosynérèse positive alors que 45% ont un ELISA positif. Les explications possibles de ces résultats ont déjà été évoquées précédemment (peu de vascularisation des aspergillomes, diminution de la production d'anticorps lors d'aspergillose massive...). Comme en médecine humaine, il semblerait donc que l'on puisse faire la même distinction pour l'utilisation de ces tests en médecine aviaire. Le test Platelia[®] serait plus intéressant pour mettre en évidence une aspergillose invasive. Une étude sur des cas avérés d'aspergilloses invasives serait nécessaire pour confirmer l'intérêt et les performances du test Platelia[®] dans ces cas précis

Conclusion

Un échantillon constitué de 123 sérums provenant de 116 oiseaux a été étudié. Les oiseaux prélevés l'ont été pour un dépistage de l'aspergillose ou parce qu'ils présentaient des signes cliniques ou des résultats d'examens complémentaires évoquant une aspergillose.

Deux examens complémentaires ont été réalisés pour chaque sérum : l'électrosynérèse et le test ELISA Platelia[®]. En considérant les oiseaux atteints d'aspergillose comme ceux ayant un résultat positif à l'ELISA et présentant des signes cliniques ou des résultats d'examens complémentaires évocateurs, il nous a été possible, pour l'échantillon étudié, d'évaluer l'efficacité du test Platelia[®] pour le diagnostic et le suivi de l'aspergillose.

Dans le cadre du diagnostic de l'aspergillose pour l'échantillon constitué ici, les calculs de sensibilité et spécificité du test ont conduit aux valeurs respectives de 30 et 86%. Ce test n'est donc pas suffisant à lui seul pour diagnostiquer une aspergillose chez les oiseaux de notre échantillon mais semble par contre assez spécifique. En revanche, le test pourrait être intéressant pour détecter des cas d'aspergillose avant l'apparition de symptômes (dépistage) puisque 21% des oiseaux prélevés pour un dépistage (8 sur 38) ont eu un résultat positif à l'ELISA. Il a été possible d'obtenir plusieurs sérums pour 6 oiseaux mais un seul sérum a donné un résultat positif à l'ELISA, il ne nous a donc pas été possible d'évaluer l'intérêt du test dans le cadre du suivi clinique à cause du manque de données.

En outre si on sépare les oiseaux suspects en deux catégories, les oiseaux probablement atteints d'aspergillose localisée et ceux probablement atteints d'aspergillose invasive, il semblerait que le test Platelia[®] soit plus intéressant pour diagnostiquer une aspergillose invasive alors que l'électrosynérèse serait plus efficace lors d'une aspergillose localisée.

Le test Platelia[®], même s'il semble insuffisant pour le diagnostic d'une aspergillose chez un oiseau, serait intéressant en association avec d'autres examens complémentaires comme l'électrosynérèse. Il pourrait aussi être intéressant de réaliser d'autres études en constituant des échantillons à partir d'une population indemne et d'une population d'oiseaux chez lesquels une aspergillose serait diagnostiquée avec certitude grâce à d'autres examens que l'électrosynérèse (endoscopie, cytologie, culture).

Annexes

Annexe 1 : feuille de commémoratifs A

Premier examen, le _ _ / _ _ / 200 _

Coordonnées du vétérinaire

nom :

adresse :

téléphone :

mail :

Identification de l'oiseau

nom du propriétaire :

espèce :

sexe :

âge :

Commémoratifs / Anamnèse

milieu de vie : cage volière intérieure extérieure

l'oiseau vit-il avec d'autres oiseaux ? oui non

si oui, préciser :

| Espèce | Nb d'oiseaux | Antécédents d'Aspergillose |
|--------|--------------|----------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

origine de l'oiseau et date d'acquisition :

alimentation :

date d'apparition des 1^{ers} symptômes :

Examen général

embonpoint (muscles du bréchet) : bien musclé
amyotrophie modérée
amyotrophie sévère

déshydratation : oui non

état général : BEG
MEG préciser : léthargie , dépression , perte de poids ,
cachexie , anémie , autre....

Examen par appareil

appareil respiratoire : dyspnée , modification de la voix , détresse respiratoire (intolérance à l'effort, bec ouvert, battements de la queue) , jetage nasal , autre

appareil digestif : régurgitations , vomissements , inappétence , anorexie , diarrhées , distension abdominale , lésions buccales , autre

appareil urinaire : biliverdinurie , PUPD , autre

système nerveux : convulsions , ataxie , parésie , paralysie , boiterie , autre

système oculaire : conjonctivite , kératite , uvéite , autre

Examens complémentaires réalisés (en particulier résultats de culture)

| Nature de l'examen | Résultat |
|--------------------|----------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Traitements mis en place

Date et circonstance de la mort

Annexe 2 : feuille de commémoratifs B

Examen de suivi, le _ _ / _ _ / 200 _

Coordonnées du vétérinaire

nom :

adresse :

téléphone :

mail :



Identification de l'oiseau

nom du propriétaire :

Evolution des symptômes

Traitements actuels

Examens complémentaires réalisés depuis l'examen précédent

Annexe 3 : feuille de commémoratifs C

Autopsie, le _ _ / _ _ / 200_

Coordonnées du vétérinaire

nom :

adresse :

téléphone :

mail :

Identification de l'oiseau

nom du propriétaire :

Circonstances de la mort

mort naturelle

euthanasie

préciser la date....

Relevé des lésions

examen général : état de développement, embonpoint :

peau et plumes :

muqueuses :

tissu sous-cutané :

cavité cœlomique, emplacement des organes :

appareil digestif :

cavité buccale et langue :

œsophage et jabot :
proventricule et gésier :
intestin grêle :
caecums :
colon et rectum :
cloaque :
foie, vésicule biliaire :
pancréas :

appareil circulatoire : péricarde et cœur :
vaisseaux :

appareil respiratoire : cavités nasales et sinus :
trachée, syrinx, grosses bronches :
poumons :
sacs aériens :

Bibliographie

- 1 AGUILAR RF, REDIG PT. Diagnosis and treatment of avian aspergillosis. *In: BONAGURA JD. Kirk's Current Veterinary Therapy: Small Animal Practice*. 12th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995, 1294-1299.
- 2 BAAZIZ S. *Les manifestations pulmonaires liées à l'aspergillus*. [en-ligne], [<http://membres.lycos.fr/samibaaziz/doctorat.html>] (consultée le 10 Juin 2004).
- 3 BAILEY T, SULLIVAN T. Aerosol therapy in birds using a novel disinfectant. *Exotic DVM*, 2001, **3**(4), 17.
- 4 BAILEY T. (2004, 24 Février) *Aspergillus detection using Platelia® Aspergillus*. [courrier électronique à Bird Medicine Discussion List] birdmed@murdoch.edu.au
- 5 BAUCK L. Mycoses. *In: RITCHIE BW, HARRISON GJ, HARRISON LR. Avian Medicine: Principles and Application*. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994, 997-1006.
- 6 BIORAD. Platelia® *Aspergillus* 62797. Notice explicative.
- 7 BOURGEOIS V. *L'aspergillose du dindon. Contribution à l'étude de l'épidémiologie chez les reproducteurs mâles*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1991, n°72, 77p.
- 8 CARRASCO L, BAUTISTA MJ, DE LAS MULAS JM, JENSEN HE. Application of enzyme-immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis, candidiasis, and zygomycosis in three lovebirds. *Avian Diseases*, 1993, **37**, 923-927.
- 9 CHAI N. "Flushing" du sinus infraorbital chez les oiseaux. *Pratique des Animaux Sauvages et Exotiques*, 2004, **4**(2), 12-13.
- 10 CHAMBON-PAUTAS C, COSTA JM, CHAUMETTE MT, CORDONNIER C, BRETAGNE S. Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia. *Journal of Infection*, 2001, **43**, 213-214.

- 11 CHERMETTE R, BUSSIERAS J. *Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fascicule V : mycologie vétérinaire.* Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Parasitologie et Maladies Parasitaires. 1993, 179p.
- 12 CHITTY J. Clotrimazole a novel disinfectant in psittacine respiratory disease. *In: Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians.* Monterey, California, 26-30 Août 2002. Bedford: AAV, 2002, 25-27.
- 13 CUTSEM JV. Antifungal activity of enilconazole on experimental aspergillosis in chickens. *Avian Diseases*, 1982, **27**, 36-42.
- 14 DEROUIN F. Aspergillose invasive nosocomiale. Diagnostic, prévention et moyens de lutte intégrée en milieu hospitalier. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 1996, **180**, 859-870.
- 15 DUPONT B. Aspergilloses invasives – Actualités thérapeutiques. *Réanimation*, 2003, **12**, 221-226.
- 16 GERMAN A. Avian aspergillosis. *In: The Aspergillus Website.* [en-ligne], [<http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/veterinary/AspAvian.html>] (consultée le 08 Mars 2004).
- 17 GERMAN A. Avian immunology and serological assays. *In: The Aspergillus Website.* [en-ligne], [<http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/veterinary/AspAvian-assay.html>] (consultée le 15 Avril 2004).
- 18 GRACZYK TK, CRANFIELD MR, KLEIN PN. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive aspergillosis. *Mycopathologia*, 1998, **140**, 121-127.
- 19 GRANDIERE-PEREZ L, PENN P, GARDEMBAS M, BOASSON M. Approche diagnostique non agressive de l'aspergillose pulmonaire invasive en hématologie. Analyse rétrospective d'une série de 16 cas. *Revue de Médecine Interne*, 2002, **23**, 259-266.
- 20 HERNANDEZ-DIVERS SJ. Endosurgical debridement and diode laser ablation of lung and air sac granulomas in psittacine birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 2002, **16**, 138-145.

- 21 IVEY ES. Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 2000, **14**, 103-106.
- 22 JENSEN HE, CHRISTENSEN JP, BISGAARD M, NIELSEN OL. Immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis in turkey poults. *Avian Pathology*, 1997, **26**, 5-18.
- 23 JENSEN HE, STYNEN D, SARFATI J, LATGE JP. Detection of galactomannan and the 18 kDa antigen from *Aspergillus fumigatus* in serum and urine from cattle with systemic aspergillosis. *Journal of Veterinary Medicine*, 1993, **40**, 397-408.
- 24 JONES MP, OROSZ SE. The diagnostic of aspergillosis in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2000, **9**(2), 52-58.
- 25 JOSEPH V, PAPPAGIANIS D, REAVILL DR. Clotrimazole nebulization for the treatment of respiratory aspergillosis. In: *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*. Reno, Nevada, 28-30 Septembre 1994. Lake Worth: AAV, 1994, 301-306.
- 26 KAWAZU M, KANDA Y, NANNYA Y, AOKI K, KUOKAWA M, SHIGERU C, *et al.* Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-Glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, **42**, 2733-2741.
- 27 KUNKLE RA, RIMLER RB. Pathology of acute aspergillosis in turkey. *Avian Diseases*, 1996, **40**, 875-886.
- 28 KUNKLE RA, SACCO RE. Susceptibility of convalescent turkeys to pulmonary aspergillosis. *Avian Diseases*, 1998, **42**, 787-790.
- 29 LATGE JP, KOBAYASHI H, DEBEAUPUIS JP, DIAQUIN M, SARFATI J, WIERUSZESKI JM, *et al.* Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 1994, **62**, 5424-5433.
- 30 LATGE JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, **12**, 310-350.

- 31 LIERZ M. Use of inhalation chamber for aspergillosis therapy. *Exotic DVM*, 2000, **2**(3), 79-80.
- 32 MENNINK-KERSTEN M, KLONT R, WARRIS A, OP DEN CAMP H, VERWEIJ P. *Bifidobacterium* lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. *The Lancet*, 2004, **363**, 325-327.
- 33 MULON PY. *Diagnostic expérimental de l'aspergillose rhinosinusale du chien*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2002, n°198, 76p.
- 34 NANCY E. *Recherche du galactomannane d'Aspergillus fumigatus dans le lait et le sérum de bovins*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2002, n°162, 93p.
- 35 NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E. *Anatomy of the domestic birds*. Berlin Hamburg: Verlag Paul Parey, 1977, 202p.
- 36 OGLESBEE BL. Mycotic diseases. In: ALTMAN RB, CLUBB SL, DORRESTEIN GM *et al*. *Avian medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 1997, 323-331.
- 37 OROSZ SE. Overview of aspergillosis: pathogenesis and treatment options. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2000, **9**(2), 59-65.
- 38 PAUGAM A. Apports et limites de la biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue Française des Laboratoires*, 1999, n°315, 39-42.
- 39 PERICARD JM. Aspergillose sans signe respiratoire sur une Amazone diadème (*Amazona autumnalis*) et sur un Perroquet gris (*Psittacus erithacus timneh*). *Pratique des Animaux Sauvages et Exotiques*, 2002, **2**(3), 7-8.
- 40 PHALEN DN. The use of serologic assays in avian medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2001, **10**(2), 77-89.
- 41 POWELL FL. Respiration. In: CAUSEY WHITTOW G. *Sturkie's Avian Physiology*. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2000, 685p.
- 42 REDIG PT, DUKE GE. Comparative pharmacokinetics of antifungal drugs in domestic turkeys, red-tailed hawks, broad-winged hawks, and great-horned owls. *Avian Diseases*, 1984, **29**, 649-661.

- 43 REDIG PT. Avian aspergillosis. In: FOWLER ME. *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. 3th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993, 178-181.
- 44 STANFORD M. Use of F10 in psittacines. *Exotic DVM*, 2001, **3**(4), 18.
- 45 STYNEN D, GORIS A, SARFATI J, LATGE JP. A new sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, **33**, 497-500.
- 46 TIZARD I. The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2002, **11**(1), 2-14.
- 47 TSAI SS, PARK JH, HIRAI K, ITAKURA C. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathology*, 1992, **21**, 699-709.
- 48 VANDERHEYDEN N. Aspergillosis in psittacine chicks. In: *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*. Nashville, 31 Août-4 Septembre 1993. 207-212.
- 49 WINGARD JR, LEATHER H. A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2004, **10**, 73-90.